

ZUSAMMENHÄNGE
ZWISCHEN
RED-OX REAKTIONEN
UND DER
BIOCHEMISCHEN WIRKUNG
VON ÖSTRADIOL

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernhard Ahlers
aus Emsdetten

Berlin 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ZUSAMMENHÄNGE
ZWISCHEN
RED-OX REAKTIONEN
UND DER
BIOCHEMISCHEN WIRKUNG
VON ÖSTRADIOL

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernhard Ahlers
aus Emsdetten

Berlin 1974



1. Gutachter: Prof. Dr. M. Wenzel
 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Möhrle
- Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit entstand in der Biochemischen- und Isotopenabteilung des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Wenzel.

Für die gute Betreuung, die wertvollen Anregungen und das große Interesse an der Arbeit bin ich Herrn Prof. Wenzel sehr dankbar.

Ferner danke ich der Med. techn. Assistentin Frl. I. H. Gatzke für ihre praktische Hilfe.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Hauptteil und Versuchsergebnisse	4
1. Einbau von Östradiol bzw. Tritium aus Östradiol im Uterus Versuche mit Östradiol-6, 7-T und Östradiol-17a-T	4
1.1. Einleitung und Literaturübersicht	4
1.2. Einbaustudien von Östradiol-6, 7-T und Östradiol-17a-T bei verschiedenen Organen	7
1.3. Einbau in chemische und morphologische Uterus- fraktionen	11
1.4. Einfluß eines SH-Blockers auf den Einbau von Tritium aus Östradiol-6, 7-T und Östradiol-17a-T	16
1.5. Zusammenfassung und Folgerung aus den Ergeb- nissen	21
2. Östradiol-Oxidation im Uterus als Östrogen Erfolgsorgan	24
2.1. Einleitung und Literaturübersicht	24
2.2. Eigenschaften der 17 β -Hydroxysteroid-Dehy- drogenasen	26
2.3. Induktion der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus	27
2.4. Nachweis der Altersabhängigkeit der Dehy- drogenase-Aktivität	33
2.5. Erfolgt im Uterus eine reversible Östradiol- Oxidation?	36
2.6. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	40

	<u>Seite</u>
3. Beeinflussung der Östradiol-Oxidation durch ein reduzierbares 17-Keto-Steroid	45
3.1. Einleitung und Literaturübersicht	45
3.2. Co-Enzymspezifität der Östradiol-Oxidation und des Tritium-Transfers	49
3.3. Mechanismus des Tritium-Transfers in der Leber Zeitabhängigkeit und Vorinkubation vor Acceptor- zugabe	53
3.4. Versuch eines Tritium-Transfers von dehydrier- baren Nicht-Steroiden auf ein Acceptor-Steroid	56
3.5. Tritium-Transfer von Östradiol-17a-T auf Androst-3en-17on im Uterus Identifizierung des Metaboliten	60
3.6. Besteht eine Konkurrenz um das Tritium von Östradiol-17a-T zwischen Acceptor-Steroid, Gewebe und Sauerstoff?	64
3.7. Zusammenfassung und Folgerung aus den Ergeb- nissen	69
C. Diskussion der Ergebnisse aus den einzelnen Abschnitten in Verbindung mit der Literatur	73
D. Material und Methodik	77
E. Literatur	90

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Hormone sind Substanzen, die im Organismus gebildet werden und die bestimmte physiologische Reaktionen beeinflussen. Nach der chemischen Struktur der Hormone unterscheidet man Steroid-Hormone, von Aminosäuren abgeleitete Hormone und Peptid- oder Proteo-Hormone. Jedem Hormon kann eine spezifische physiologische Wirkung zugeordnet werden. Während eine Anzahl von Hormonen in jedem Organ vorkommt, gibt es geschlechtsspezifische Hormone, die Sexualhormone. Sie gehören zu der Gruppe der Steroid-Hormone. Das wichtigste männliche Sexualhormon ist das Testosteron, das typisch weibliche Hormon das Östradiol.

Diese Hormone werden in der Forschung als Mustersubstanzen vielfach verwendet, um die Kenntnisse über die Hormonwirkung zu vertiefen. Das Gebiet der Steroid-Forschung läßt sich vereinfachend in drei Teilbereiche gliedern:

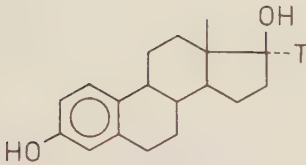
1. Die eine Richtung befaßt sich mit der Bindung von Steroid-Hormonen im Erfolgsorgan an Rezeptoren. Es soll die Frage geklärt werden, wie das Hormon an seinen Wirkungsort gelangt und worin die primäre Hormonwirkung zu sehen ist.
2. Eine andere Arbeitsrichtung beschäftigt sich mit den enzymatischen Prozessen am Steroid-Molekül und in Gegenwart des Hormons. Dabei geht es in erster Linie darum, die Verstoffwechslung und Metabolisierung des Steroid-Hormons zu klären.
3. Ein weiteres Arbeitsgebiet liegt in der Untersuchung der Wirkung von Steroid-Hormonen auf den Organismus. Ziel dieser Forschungen ist es, festzustellen, an welchen Stellen im Organismus die Steroid-Hormone ihre Wirkung ausüben und welche biochemischen Vorgänge

durch Steroid-Hormone gesteuert und beeinflußt werden.

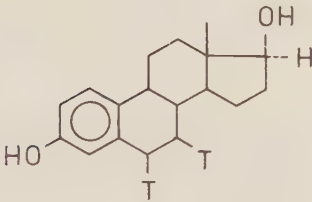
In dieser Arbeit sollen mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Literatur und an Hand der eigenen Versuchsergebnisse folgende Fragen geklärt werden:

1. Ist im Uterus als Östrogen Erfolgsorgan eine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase vorhanden, die Östradiol-17 β zu Östron oxydiert?
2. Kann die Östradiol-Oxidation durch ein reduzierbares 17-Keto-Steroid beeinflußt werden?

Östradiol



$E_2-17\alpha-T$



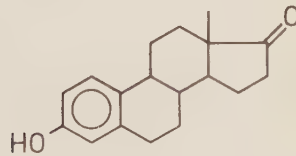
$E_2-6,7-T$

$E_2-17\alpha-T$:

stoffwechsel-labile

Markierung:

Steroid-Gerüst verliert
bei Oxidation an C 17
die Radioaktivität

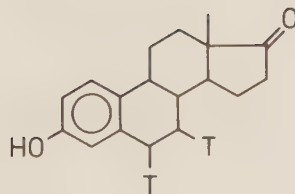


$E_2-6,7-T$

stoffwechsel-stabile

Markierung:

Radioaktivität bleibt
bei Oxidation an C 17
am Steroid-Gerüst



B. HAUPTTEIL UND VERSUCHSERGEBNISSE

1. Einbau von Östradiol bzw. Tritium aus Östradiol im Rattenuterus

1.1. Einleitung und Literaturübersicht

Ausführliche Arbeiten über die Bindung von Östradiol im Uterus liegen vor von Jensen und Mitarbeitern (1), die auf Grund ihrer Untersuchungen detaillierte Vorstellungen über die Rezeptor-Bindung von Östradiol und den Transportmechanismus in der Zelle entwickelt haben.

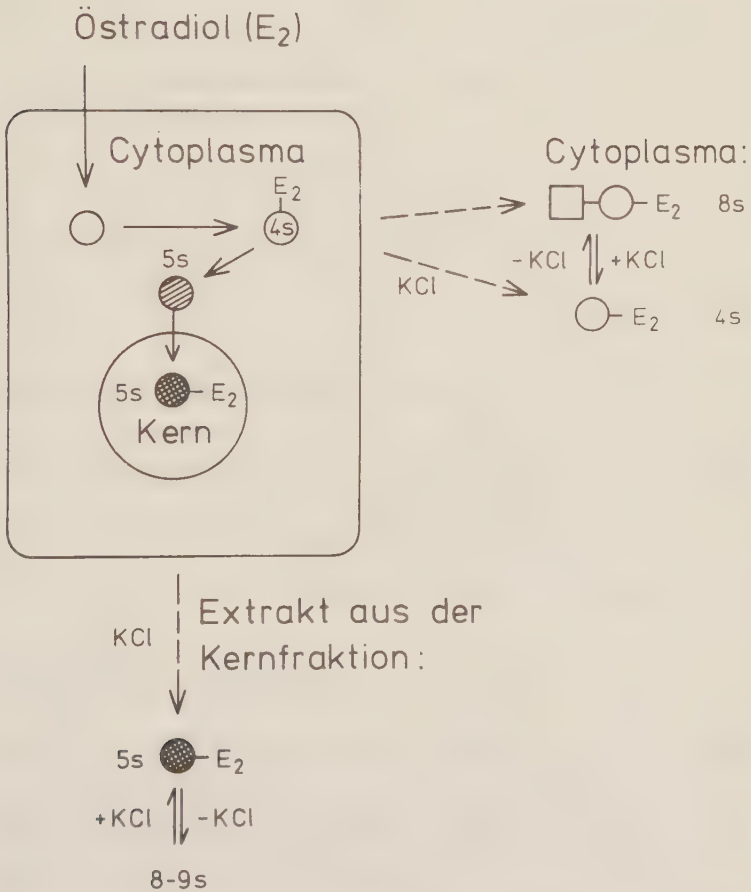
Zu Beginn der Forschungen auf dem Gebiet wird festgestellt, daß die charakteristische Affinität von Östrogen-Erfolgsorganen für Östradiol zurückzuführen ist auf die Gegenwart von spezifischen, hormonbindenden Makromolekülen, den sogenannten Östrogen-Rezeptoren. In weiterführenden Untersuchungen wird gezeigt, daß die Bindung von Östradiol in der Uterus-Zelle zunächst an einen cytoplasmatischen Rezeptor erfolgt, der in hoher Konzentration vorliegt und der relativ unspezifisch ist. In einem temperaturabhängigen Schritt erfolgt dann die Transformation zum Kern-Rezeptor. Dieser Kern-Rezeptor-Östradiol-Komplex wandert an eine Stelle im Chromatin des Kerns, die als Acceptor dient. Von dort aus erfolgt die Information für die verschiedenen hormongesteuerten Reaktionen.

Die Östrogen-Rezeptoren stellen chemisch Makromoleküle mit Proteinstruktur dar. Durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation kann man sie charakterisieren und isolieren.

Jensen (2) nennt zwei Möglichkeiten als wirksames Prinzip der Rezeptoren:

Abbild.1: Hormon-Rezeptor-Wirkung

Schematische vereinfachte Darstellung der Östradiol-Rezeptor-Wechselwirkung nach Jensen



Entweder stellt der Hormon-Rezeptor-Komplex lediglich das Transport-medium für das Hormon dar, oder durch die Bindung des Steroids an das Rezeptor-Protein wird dieses aktiviert und gelangt so in den Kern.

Andere Autoren haben sich mit Einzelheiten dieses allgemein akzeptierten Schemas auseinandergesetzt und finden weitere wichtige Fakten.

Es wird nachgewiesen, daß zur Bildung des Kern-Rezeptor-Komplexes cytoplasmatische Faktoren nötig sind (3). Terenius untersucht am Mäuseuterus die hohe Organspezifität der Östradiol-Bindung und die kompetitive Hemmung der Bindung durch andere Steroide (4). An anderer Stelle wird der Einfluß östrogen wirksamer Substanzen, nicht aber anderer Steroide, auf den Östradiol-Einbau beschrieben (5). Auch die Konzentration der Rezeptoren wird untersucht, wobei sich eine Cyclus-abhängigkeit ergibt und eine sinkende Konzentration von infantilen zu erwachsenen Ratten (6).

Der Kern-Rezeptor-Hormon-Komplex ist relativ stabil. Es erfolgt nur eine langsame Dissotiation des Östradiols vom Kern-Rezeptor (7). Ungeklärt ist die Frage nach dem weiteren Verbleib des Östradiols. Es wird vermutet, daß das Östradiol vom Kern-Rezeptor abdissoziiert und in einem Kreisprozeß über den cytoplasmatischen Rezeptor wieder eine Transportfunktion zum Kern-Rezeptor übernimmt (1).

Als erste biochemische Reaktion, ausgelöst durch den Kern-Rezeptor-Hormon-Komplex, weisen Jensen et al. eine erhöhte RNA-Polymerase Aktivität nach (2, 8). Mit RNA Praecursoren untersucht Hamilton die Synthese von RNA und beobachtet, daß der Einbau in die Kern-RNA viel rascher erfolgt als der Einbau in die cytoplasmatische-RNA. Daraus folgert er, daß unter dem Einfluß von Östradiol die Kern-RNA ins Cytoplasma transportiert wird (9).

1.2. Einbau von Östradiol-17a-T und Östradiol-6, 7-T in verschiedene Organe unter in vivo Bedingungen

Für die Versuche der Rezeptor-Bindung von Östradiol stehen verschiedene radioaktiv markierte Steroide zur Verfügung. Bei Östradiol-4-¹⁴C oder Östradiol-6, 7-T handelt es sich um stabil markierte Moleküle. Bei einer möglichen Oxidation am C-17 beim Östradiol Molekül bleibt die Radioaktivität am Steroid Gerüst. Verwendet man für diese Untersuchungen Östradiol-17a-T, so kann durch Oxidation am C-17 das Tritium aus dem Molekül eliminiert werden. Es liegt ein labil markiertes Molekül vor.

Jensen benutzt für seine Rezeptor Forschung Östradiol-17a-T, andere Autoren arbeiten mit stabil markierten Steroiden.

In diesem Versuch soll parallel unter identischen Bedingungen der Einbau von Radioaktivität aus Östradiol-17a-T und Östradiol-6, 7-T im Uterus und andere Organe gemessen werden.

Wenn das intakte Molekül Östradiol eingebaut wird, muß die Einbaurate bei beiden markierten Steroiden gleich sein. Es wird bisher auch angenommen, daß im Uterus als Östrogen Erfolgsorgan keine Metabolisierung des Moleküls erfolgt. Bei verschiedenen Autoren wird das eingebaute Östradiol identifiziert, und sie finden keine Anzeichen für eine Östradiol-Oxidation.

Wenzel und Mitarbeiter (10) führen Versuche durch zum vergleichenden Einbau von Östradiol-6, 7-T und Östradiol-17a-T unter in vitro Bedingungen. Dabei stellt sich heraus, daß ein bevorzugter Tritium-Einbau aus Östradiol-17a-T gegenüber Östradiol-6, 7-T stattfindet, sowohl im Gesamt-Uterus als auch in chemische Uterus-Fractionen.

Die eigenen Versuche werden mit der gleichen Zielsetzung unter in vivo Bedingungen durchgeführt.

Infantilen Rattenweibchen wird radioaktiv markiertes Östradiol (Östradiol-17a-T oder Östradiol-6, 7-T) injiziert. Nach verschiedenen Zeiten werden die Tiere getötet. Von verschiedenen Organen werden Gewebeproben entnommen und wie in Methodik näher beschrieben zur Bestimmung des gebundenen Östradiols bzw. der gebundenen Radioaktivität aufgearbeitet.

Abbildung 2 zeigt, daß im Vergleich zu den anderen Organen deutlich mehr Radioaktivität im Uterus vorliegt. Der Effekt ist bei beiden markierten Steroiden gleich. 17 Stunden nach Injektion wird weniger Radioaktivität in den Gewebe-Proben gefunden als nach 5 Stunden nach Injektion von Östradiol.

Ein bevorzugter Einbau von Aktivität aus Östradiol-17a-T gegenüber Östradiol-6, 7-T, wie unter in vitro Bedingungen im Uterus gefunden wird, kann in diesem Versuch in der gemessenen Fraktion nicht nachgewiesen werden.

Vielmehr liegen die Werte beim Östradiol-6, 7-T höher als beim Östradiol-17a-T.

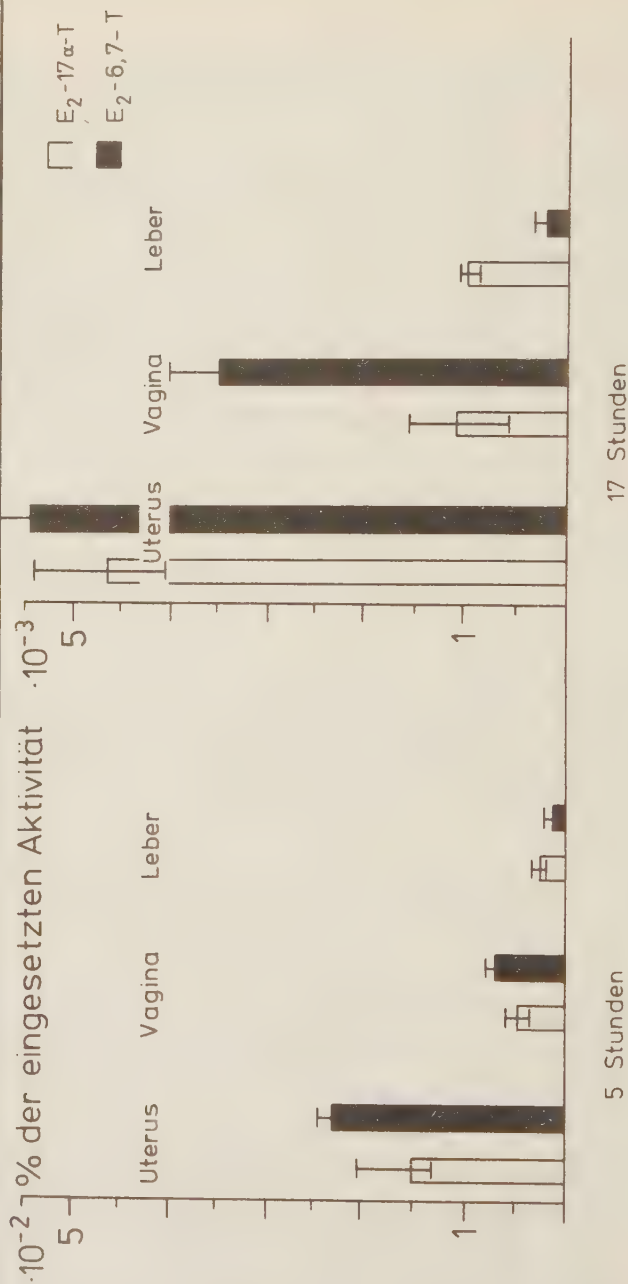
Der Unterschied im Einbau-Schema bei Östradiol-6, 7-T und Östradiol-17a-T zwischen in vitro und in vivo Versuchen läßt sich folgendermaßen deuten:

Bei der Passage des Organismus verliert Östradiol-17a-T bei einer Oxidation in der Leber sein Tritium. Es entsteht HTO, welches sich im Gesamtkörperwasser verteilt und nicht gemessen wird. Unter in vitro Bedingungen fehlt z. B. bei Uterus-Inkubationen die Leberoxidation, so daß sich kaum HTO bildet.

Dafür spricht der hohe Anteil an Radioaktivität im Perchlorsäure Extrakt des Gewebes, wo die Co-Enzyme NADH und NADPH zu finden sind (10). Unter in vivo Bedingungen findet man im Uterus und in der Vagina mehr Aktivität aus Östradiol-6, 7-T. Das besagt, daß diese Organe eine Affinität auch für Östron besitzen. Denn wenn primär die gleiche Menge Östradiol gebunden wird, bedeutet der höhere Anteil an Aktivität bei Östradiol-6, 7-T, daß ein Teil des stabil markierten Moleküls nicht als Östradiol, sondern als Östron vorliegt. In der Leber liegt weniger Östron vor. Hier erfolgt in der Hauptsache die Metabolisierung und Ausscheidung des Steroids.

Abbild. 2: Organspezifität der Östradiol Bindung

I. p. Injektion von 0, 2 μ g E_2 -17 α -T bzw. E_2 -6, 7-T bei infantilen Rattenweibchen. Nach 5 bzw. 17 Std. Organentnahme und Nachinkubation mit 10^{-7} M/1 inaktivem E_2 zur Entfernung des nicht gebundenen Östradiols, 60 Min. bei 25° C. Gemessen wird der Lipoidextrakt von Uterus, Vagina und Leber. Werte bezogen auf 10 mg Gewebe, n = 4



1.3. Einbau von Östradiol bzw. Tritium aus Östradiol in morphologische Uterus-Zell-Fractionen

Nach Injektion von Östradiol-6, 7-T in infantile Rattenweibchen führen Noteboom und Gorski (11) eine Auftrennung des Uterus-Gewebes in morphologische Fractionen durch. Auf diese Weise erhalten sie ein Verteilungsmuster von Aktivität innerhalb der verschiedenen Zell-Fractionen.

In Anlehnung an ihre Vorschrift und Arbeitstechnik wird der gleiche Versuch durchgeführt mit Östradiol-17a-T, um festzustellen, ob eine Parallelität besteht im Verteilungsmuster von Aktivität aus Östradiol-6, 7-T und Östradiol-17a-T.

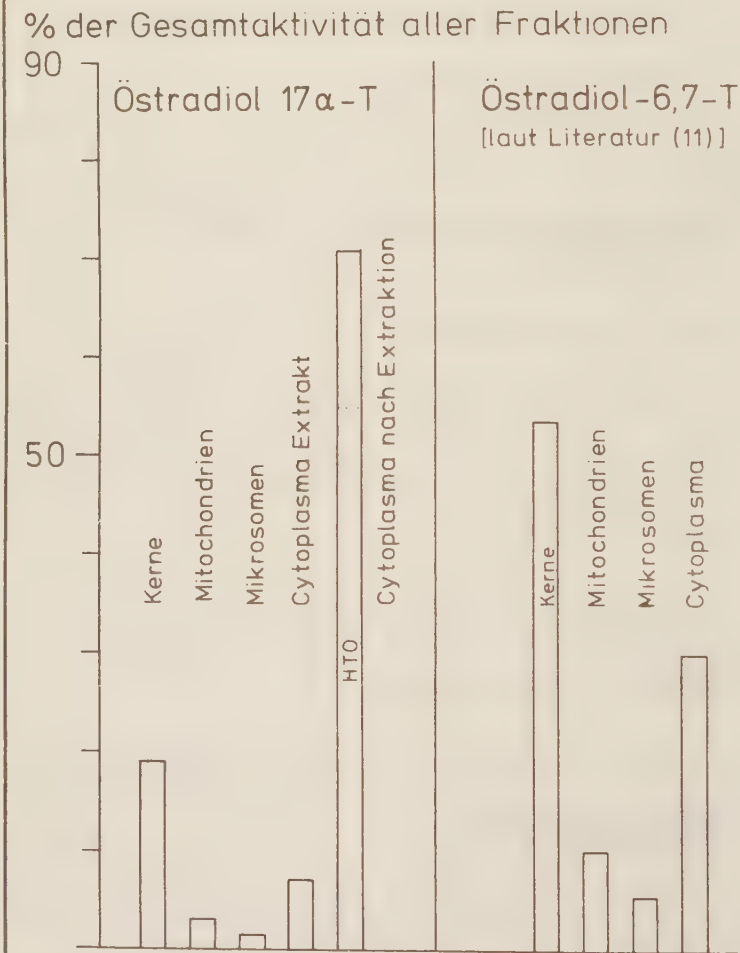
Infantilen Rattenweibchen wird Östradiol-17a-T injiziert. Nach zwei Stunden werden die Tiere getötet und die Uteri entnommen. Wie in Methodik beschrieben, erfolgt durch Zentrifugation eine Auftrennung in Zellkerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Cytoplasma. Die einzelnen Fractionen werden extrahiert und die Radioaktivität gemessen.

Das Ergebnis, dargestellt in Abbildung 3, zeigt ein anderes Verteilungsmuster der Aktivität bei Östradiol-17a-T als von Noteboom und Gorski für Östradiol-6, 7-T angegeben wird.

Bei Verwendung von Östradiol-17a-T liegt die Hauptaktivität in der cytoplasmatischen Fraction, bei Östradiol-6, 7-T in der Kern-Fraction. Aus der Cytoplasma-Fraction ist nur ein geringer Teil an Radioaktivität mit lipophilen Lösungsmitteln extrahierbar. Der größere Teil der Radioaktivität liegt in anderer chemischer Form in der wässrigen cytoplasmatischen Phase vor. Der größte Teil der nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahierbaren Aktivität wird durch Gefrierdestillation als HTO identifiziert.

Abbild.3: Östradiol Einbau im Uterus in vivo

I. p. Injektion von $0,2 \mu\text{g } E_2-17\alpha\text{-T}$ bei infantilen Rattenweibchen. Nach 2 St. Präparation der Uteri: Nachinkubation und Zellfraktionierung. Anschließend Äthanol, CHCl_3 und Aether Extraktion. Von 20 Tieren werden 10 Uteri zusammen aufgearbeitet. $n = 2$



Dieser Unterschied im Einbau von Aktivität aus Östradiol-17a-T und Östradiol-6, 7-T soll im nächsten Versuch verdeutlicht werden.

Infantile Rattenuteri werden mit Östradiol-17a-T bzw. mit Östradiol-6, 7-T inkubiert. Nach der Aufarbeitung des Gewebes (siehe Methodik) wird die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen bestimmt.

Aus dem Vergleich der Einbauraten (siehe Abbildung 4) geht hervor, daß bezogen auf die eingesetzte Aktivität mehr Tritium aus Östradiol-17a-T eingebaut wird als aus Östradiol-6, 7-T, und zwar in allen Fraktionen.

Dies stimmt überein mit früheren Befunden, wo unter in vitro Bedingungen ein bevorzugter Einbau von Tritium aus Östradiol-17a-T in chemische Uterus-Fraktionen festgestellt wird (10).

Bei beiden Steroiden liegt der größte Teil der Radioaktivität in der Kern Fraktion.

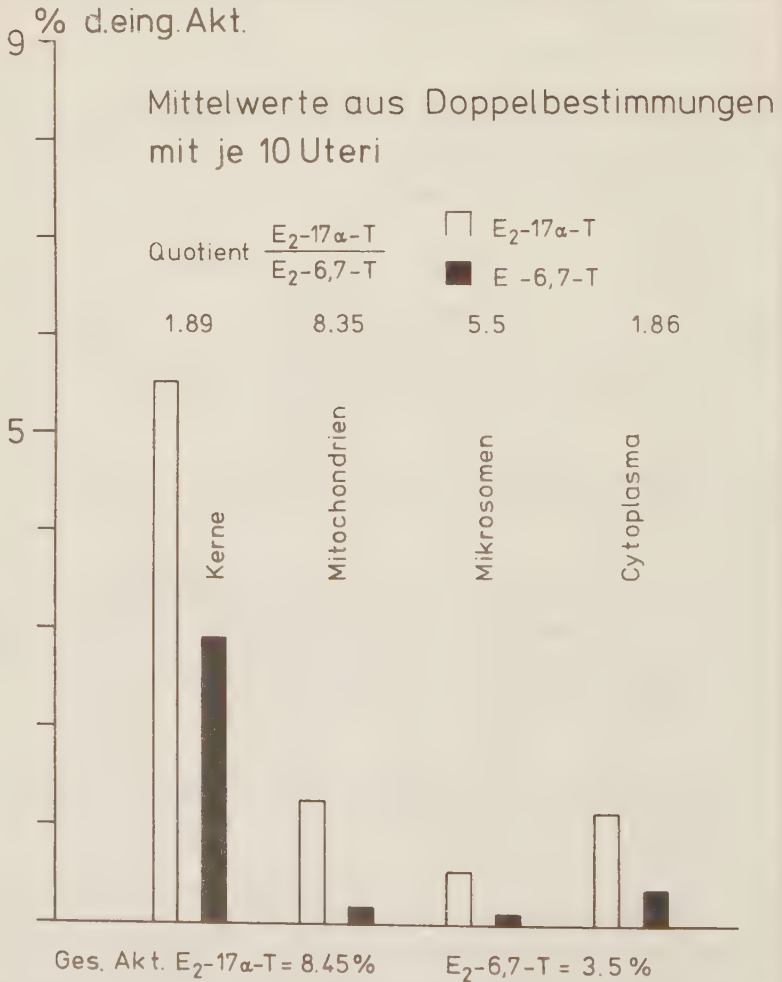
Betrachtet man die Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen, wobei die Aktivität aller Fraktionen jeweils gleich 100 Prozent gesetzt wird, so fällt auf, daß aus Östradiol-6, 7-T mehr Aktivität in der Kern Fraktion gebunden ist als bei Östradiol-17a-T.

Im Cytoplasma und in der Mitochondrien-Fraktion findet man bei Östradiol-17a-T mehr Aktivität als bei Östradiol-6, 7-T.

Zur Erklärung kann man, wie schon erwähnt, eine geringe Affinität der Zelle für Östron heranziehen. Der höhere Anteil an Aktivität im Cytoplasma und in den Mitochondrien bei Östradiol-17a-T deutet auf Tritium reduzierte Co-Enzyme hin.

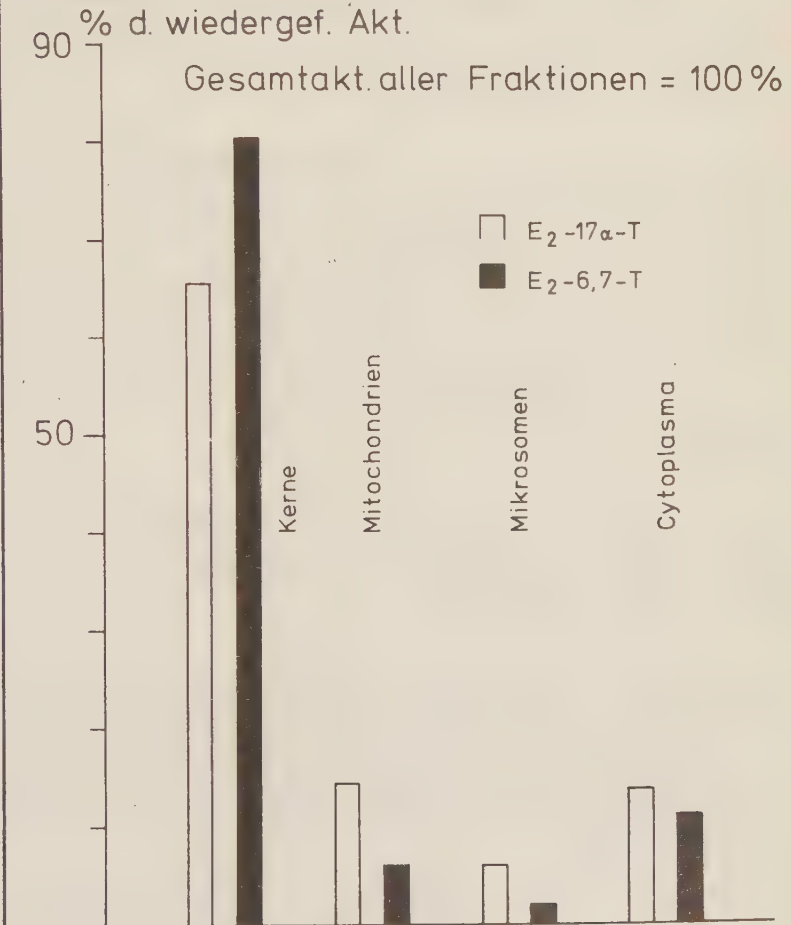
Abbild.4: E₂-Einbau in vitro in infant. Uterus-Fractionen

Jeweils 10 Uteri werden inkubiert mit $3 \cdot 10^{-9}$ M/l E₂-17 α -T bzw. E₂-6,7-T, 90 Min. 37° C. Nachinkubation mit 10^{-7} M/l E₂ inaktiv. 60 Min. bei 25° C. Anschließend Zellfraktionierung. Die Messung erfolgt nach Auflösung des biolog. Materials in Soluene. Cytoplasmamessung erfolgt direkt.



Abbild.5: E₂-Einbau in vitro in infant. Uterus-Fraktionen

Darstellung der nach der Methodik in Abbildung 4 erhaltenen Werte bezogen auf die wiedergefundene Aktivität. Gesamtaktivität aller Fraktionen = 100 %



1.4. Einfluß von SH-Blockern auf den Einbau von Tritium aus Östradiol-17a-T und Östradiol-6, 7-T

Gemäß Abbild. 2, 3, 4 sind im infantilen Rattenuterus durch in vitro und in vivo Versuche Unterschiede in dem Einbau von Radioaktivität aus Östradiol-17a-T und Östradiol-6, 7-T nachgewiesen. Die Bindung von Östradiol im Gewebe an Rezeptoren wird gemessen an Hand der Radioaktivität des markierten Steroids.

Jensen (12) führt im Rahmen seiner Rezeptor-Studien außerdem Einbau-Versuche mit Östradiol-6, 7-T im Rattenuterus durch unter dem Einfluß von sogenannten Sulfhydrylblockern, um die chemische Bindungsart von Östradiol im Uterus an Rezeptoren zu studieren. Er findet, daß nach Vorinkubation mit diesen SH-Blockern keine Bindung von Östradiol-6, 7-T im Uterus erfolgt. Er weist nach, daß bereits gebundenes Östradiol durch Nachinkubation mit diesen SH-Blockern wieder ausgewaschen werden kann.

In eigenen Versuchen wird der Einfluß eines SH-Blockers auf die Einbaurate von Aktivität aus Östradiol-17a-T und Östradiol-6, 7-T im Uterus gemessen (Abbildung 6).

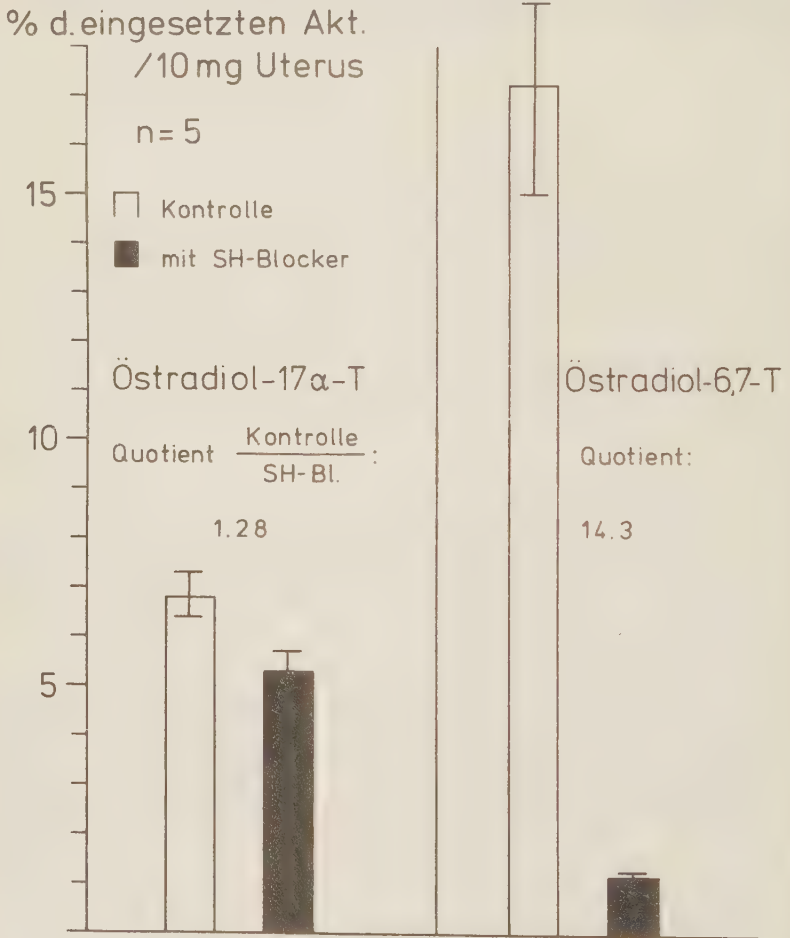
Unter in vitro Bedingungen erfolgt zunächst eine Vorinkubation, damit der SH-Blocker auf das Gewebe einwirkt und die Rezeptoren blockiert. In der folgenden Hauptinkubation wird dem Gewebe Östradiol angeboten, und durch die Nachinkubation wird nicht gebundenes Östradiol entfernt.

Der Versuch mit Östradiol-6, 7-T bestätigt das Ergebnis von Jensen: Im Vergleich zum Kontrollwert wird der Einbau von Östradiol-6, 7-T stark reduziert.

Bei dem Versuch mit Östradiol-17a-T ist unter dem Einfluß des SH-Blockers kaum eine Verringerung des Tritium Einbaus festzustellen.

Abbild.6: E₂-Bindung im Uterus in Gegenwart von SH-Blockern

In vitro Inkubation mit infantilen Rattenuteri: 10 Uteri ohne Blocker, 10 mit 10^{-3} M/l p-Chlormercuribenzoat Vorinkubation, Hauptinkubation mit 10^{-9} M/l E₂-17 α -T od. $4 \cdot 10^{-9}$ M/l E₂-6,7-T, 120 Min. bei 37° C. jeweils 5 Uteri zusammen. Nachinkubation mit 10^{-7} M E₂ inaktiv, anschließend Gewebeverbrennung.



In einem weiteren Versuch wird der Einfluß des SH-Blockers auf das Verteilungsmuster von Aktivität in chemischen Uterus-Fraktionen untersucht (siehe Methodik).

Wie aus Abbildung 7 ersichtlich, ist auch hier ein hemmender Effekt des SH-Blockers auf den Einbau von Östradiol zu erkennen. Die Kontrollwerte zeigen, daß in allen Fraktionen bevorzugt Tritium aus Östradiol-17a-T eingebaut wird.

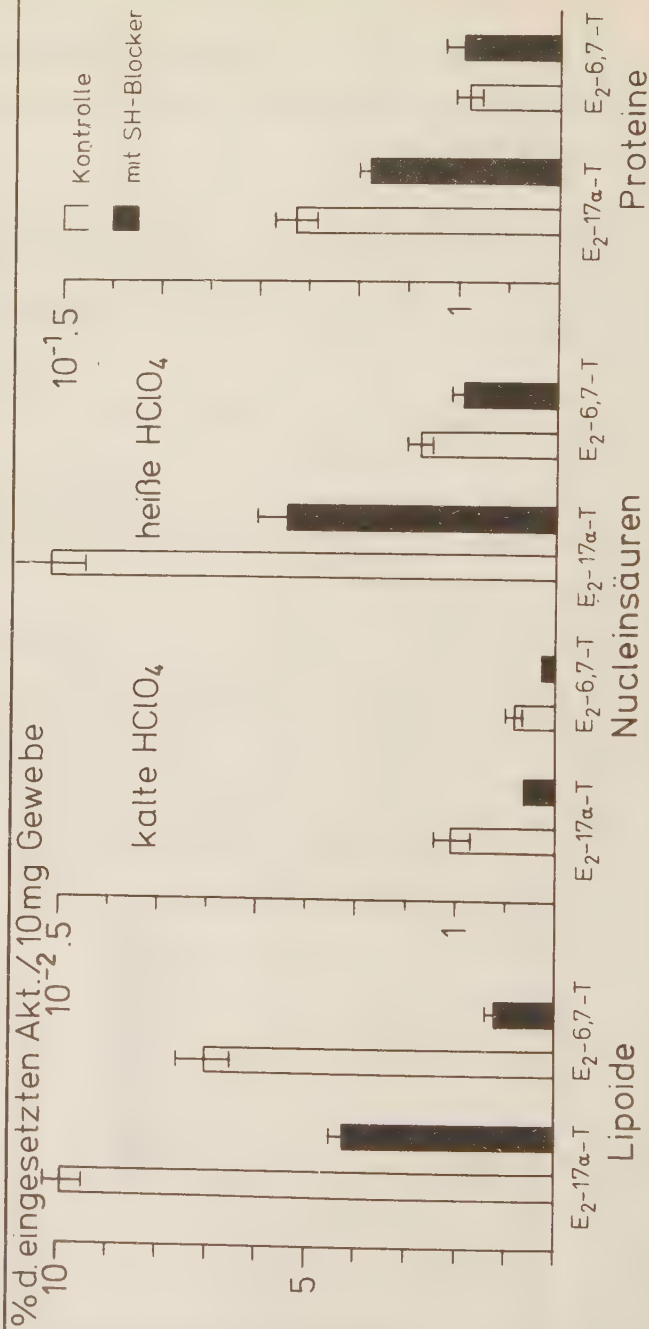
Die gefundenen Effekte lassen folgende Schlüsse zu:

Die Östradiol Bindung an den Rezeptor erfolgt über das intakte Molekül, demonstriert an der hemmenden Wirkung des SH-Blockers nur auf den Einbau von Östradiol-6, 7-T.

Der Einbau von Tritium aus Östradiol-17a-T ist nicht identisch mit dem Einbau von Östradiol. Östradiol wird oxydiert und verliert das Tritium, welches bei reduktiven Synthesen im Gewebe verwendet wird. Die Gegenwart des SH-Blockers verhindert nicht die Östradiol Oxidation. Das besagt, daß die Bindung von Östradiol an den Rezeptor nicht erforderlich ist für die Östradiol Oxidation. Daraus kann man schließen, daß an Rezeptor gebundenes Östradiol nicht oxydiert wird, sondern nur freies Östradiol.

Abbild.7:SH-Blocker Effekt auf E₂-Einbau in Uterus Fraktionen

Vorinkubation: 10 Uteri mit Blocker, 10 ohne, 30 Min. 37° C. Hauptinkubation: 5 Uteri mit Steroid und Blocker, vorbehandelt, 5 Uteri ohne Blocker, jeweils mit 10⁻⁹M/l E₂-17α-T und E₂-6,7-T, 90 Min. 37° C. Nachinkubation: 60 Min. 25° C mit 10⁻⁷M/l E₂ inaktiv. Anschließend Fraktionierung des Gewebes in chem. Fraktionen.



1.5. Zusammenfassung und Folgerung aus den Ergebnissen

Anlaß für die durchgeführten Versuche zum Einbau von Östradiol-6, 7-T und Östradiol-17a-T ist die Unsicherheit in der Literatur über die chemische Form der Radioaktivität, die bei solchen Einbau-Versuchen gemessen wird.

Beim Östradiol-6, 7-T besteht die Möglichkeit, daß es zu Östron oxidiert wird. Da bei diesen Versuchen in physiologischen Konzentrationen mit ca. 10^{-10} Mol/l bei invitro Versuchen und 0,1 μ g pro Tier bei in vivo Versuchen gearbeitet wird, fällt es schwer, entstandenes Östron nachzuweisen. Außerdem ist, wenn überhaupt, nur mit einer geringen Oxidationsrate zu rechnen, was die Identifizierung eines Metaboliten erschwert. Vereinfachend wird weiterhin angenommen, daß Östron im Uterus-Gewebe nicht gebunden wird.

Benutzt man für diese Versuche der Östradiol-Bindung im Uterus Östradiol-17a-T, so ergeben sich ähnliche Schwierigkeiten. Erschwerend kommt hinzu, daß über die chemische Form des Tritiums noch größere Unsicherheit besteht als beim Östradiol-6, 7-T, da hier das Tritium stoffwechsel-labil gebunden ist und bei einer chemischen Reaktion des Östradiol-Moleküls nicht am Steroid-Gerüst verbleibt.

Bis auf die in den Versuchen durchgeführten Zuordnungen zu chemischen oder morphologischen Fraktionen wird die chemische Form des Tritiums aus Östradiol nicht näher identifiziert.

Wichtigstes Ergebnis dieser Versuche ist die Tatsache, daß keine Parallelität besteht zwischen dem Tritium Einbau aus Östradiol-6, 7-T und Östradiol-17a-T. In keinem Fall kann bei identischer Methodik eine Übereinstimmung der Ergebnisse mit den beiden mar-

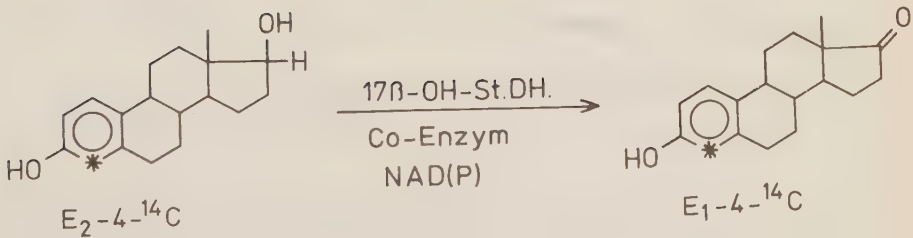
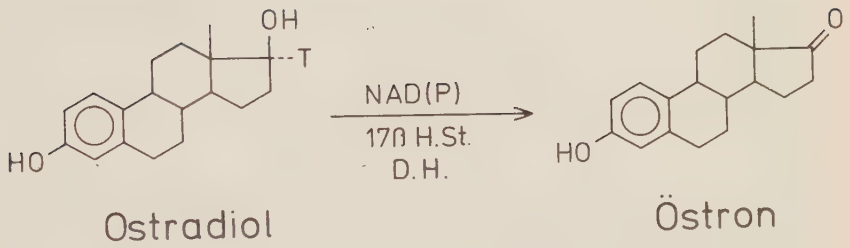
kierten Steroiden erzielt werden. Daraus kann man schließen, daß das Östradiol im Uterus-Gewebe chemisch verändert wird. Naheliegend ist eine Oxidation am C-17, wodurch bei Östradiol-17a-T das Tritium eliminiert wird.

Dieser Schritt kann nur enzymatisch ablaufen. Das besagt, daß auch im Uterus eine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase anwesend sein muß.

Wenn eine Östradiol-Oxidation im Uterus in Betracht gezogen werden muß, bleibt zu untersuchen, wie und wann die Oxidation in Verbindung mit der Theorie von Jensen über die Rezeptoren erfolgt. Wird das Östradiol oxydiert, welches die cytoplasmatischen Rezeptoren besetzt, nicht aber zum spezifischen Kern-Rezeptor gelangt? Wird Östradiol erst dann oxydiert, wenn es vom Kern-Rezeptor nach Erfüllung seiner Funktion abdissoziiert?

Im Rahmen dieser Arbeit können die noch offenen Fragen nicht verfolgt werden. Vielmehr soll im weiteren Verlauf der Versuche auf die Oxidationsvorgänge im Uterus weiter eingegangen werden.

Oestradiol - Oxidation



2. Östradiol-Oxidation im Uterus als Östrogen-Erfolgsorgan

2.1. Einleitung und Literaturübersicht

Bei der Untersuchung von enzymatischen Prozessen am Steroid Molekül wird in erster Linie der Effekt von Enzymen auf Steroid-Hormone behandelt. Von gleich großem Interesse ist auch die umgekehrte Fragestellung, welchen Einfluß Steroid-Hormone auf bestimmte Enzymsysteme ausüben. Talalay (13) hält in einem Bericht über den Mechanismus der Enzymwirkung eine Beziehung für möglich zwischen enzymatischen Prozessen und der molekularen Grundlage der Hormonwirkung in den Hormon abhängigen Organen.

Forschungen auf dem Gebiet der Biosynthese von Proteinen und Nucleinsäuren haben die Aussage ermöglicht, daß eine Reihe von Hormonen die Synthese von spezifischen Proteinen beeinflusst. Dieser Kontrollmechanismus erfolgt über die Übermittlung der genetischen Information, welche die Protein Biosynthese steuert.

Talalay nennt zwei Möglichkeiten für die Hormonwirkung der Steroide.

1. Bestimmte Steroide können als Katalysatoren an Reaktionen beteiligt sein, die einen Wasserstoff Transport bewirken.
2. Steroide beeinflussen eine Reihe von Enzymen auf allosterische Weise, es erfolgt eine Aktivierung oder eine Inhibierung der Enzyme.

An anderer Stelle wird ebenfalls der Einfluß von Östradiol auf die Protein Biosynthese beschrieben, und zwar eine Östradiol bedingte Enzym-Induktion im Rattenuterus (14, 15). Bei Versuchen mit menschlichem Endometrium und Myometrium finden Sweat et al. (16) eine Östradiol-

Oxidation wie auch eine Östron-Reduktion, wobei das Gleichgewicht auf der Seite von Östron liegt. Es taucht die prinzipielle Frage auf, ob die hormonelle Wirksamkeit von Östrogenen mit einer Biotransformation des Moleküls verbunden ist, oder ob Östrogene ihre Wirkung ausüben ohne chemische Veränderung des Moleküls.

Ergebnisse von Pack und Brooks (17) zeigen ebenfalls eine Östradiol-Oxidation im Uterus und eine konzentrationsabhängige Reduktion von Östron bei hohen Dosen.

Aus der Literatur geht hervor, daß das Hormon Östradiol eine biochemische Kontrolle auf die Protein Biosynthese ausübt, wie bei der Enzym-Induktion, auf der anderen Seite das Enzym die Konzentration der Hormone kontrolliert, wie bei der Cyclus-Abhängigkeit der Östradiol-Oxidation (17, 26).

Dem gegenüber stehen Ergebnisse von Jensen, Jacobsen et al. (27), wonach weder im infantilen noch im erwachsenen Uterus Östradiol oxydiert wird. Sie finden auch keine Anzeichen für eine reversible Östradiol-Oxidation.

In den folgenden Versuchen werden aus diesem Problemkreis drei Aspekte behandelt:

1. Läßt sich im Uterus erwachsener Ratten die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase induzieren?
2. Ist die Aktivität des Enzyms vom Alter der Tiere abhängig?
3. Erfolgt eine reversible Östradiol Oxidation?

2.2. Eigenschaften der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

Es existieren viele Arbeiten über Hydroxysteroid-Dehydrogenasen, welche NAD(P) abhängig, stereospezifisch, oft völlig reversibel, Hydroxy- und Keto-Gruppen am Ring-Gerüst oder der Seitenkette in einander umwandeln. Die Darstellung und Reinigung, die Co-Enzym-Spezifität, Substrat-Spezifität und die kinetischen Daten werden ausführlich beschrieben.

Breuer und Mitarbeiter finden in verschiedenen Organen eine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, die angereichert und charakterisiert wird (18 - 21).

Karavolas et al. (22) beschreiben eine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus menschlicher Placenta.

Jütting und Mitarbeiter (23) ziehen ein Erfolgsorgan als Enzymquelle heran: Sie finden im Myometrium von Kaninchen eine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, deren Aktivität vom Cyclus Stadium abhängig ist und die sich durch Östrogene induzieren läßt. Die kinetischen Daten lassen sich vergleichen mit denen eines placentaren Enzyms und anderer Dehydrogenasen.

Da viele Dehydrogenasen nicht nur mit einem Co-Enzym reagieren, wird ihnen die Fähigkeit zugeschrieben, auch eine Transhydrogenase Funktion von einem Co-Enzym auf das andere zu katalysieren, abhängig von der Gegenwart von Steroiden (24, 25).

Talalay macht die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase für alle Östrogen abhängigen Transhydrogenase Reaktionen verantwortlich. Damit ist verbunden, daß eine reversible Oxidation von Östradiol und anderen Red-Ox Paaren von Steroiden möglich ist.

2.3. Induktion der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus

An Hand von Versuchen mit Myometrium von Kaninchen zeigt Jütting (26) eine Enzyminduktion der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase durch Vorbehandlung mit Östrogenen. Wenzel und Hieronimus (27) beschreiben eine Enzym-Induktion nach Vorbehandlung mit Östradiol im Ratten-Uterus. Im Zusammenhang mit der Enzym-Induktion wird auch eine Cyclus-Abhängigkeit der Östradiol-Oxidation gefunden (28). Diese Ergebnisse sind in Zusammenhang zu bringen mit Befunden von Hori et al. (29), wo die Östrogen-Sekretion des Ovars von Ratten während des Cyclus gemessen wird. Danach steigt die ovarielle Östradiol-Produktion vom Diöstrus zum Proöstrus an, um dann kurz vor dem Östrus wieder auf einen Minimalwert abzufallen.

Die Anwesenheit von Östrogenen im Uterus bewirkt nicht nur eine Enzym-Induktion der Dehydrogenase, sondern neben anderen biochemischen Reaktionen auch die Induzierung einer Peroxidase, welche die Oxidation von Östradiol zu Östron katalysiert (30).

Da die Angaben über die Östradiol-Oxidation im Uterus und die Enzym-Induktion zum Teil widersprüchlich sind, soll in eigenen Versuchen eine Induktion der Östradiol-Dehydrogenase nach Östradiol Vorbehandlung nochmals systematisch untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

Erwachsenen Rattenweibchen werden 1 mg pro kg Körpergewicht Östradiol bzw. Diäthylstilböstrol oder reines Lösungsmittel injiziert. Nach 20 Stunden werden die Uteri durch Vaginalabstriche auf ihren physiologischen Zustand untersucht. Anschließend werden die Uteri präpariert und mit Östradiol-4-¹⁴C inkubiert.
(siehe Methodik)

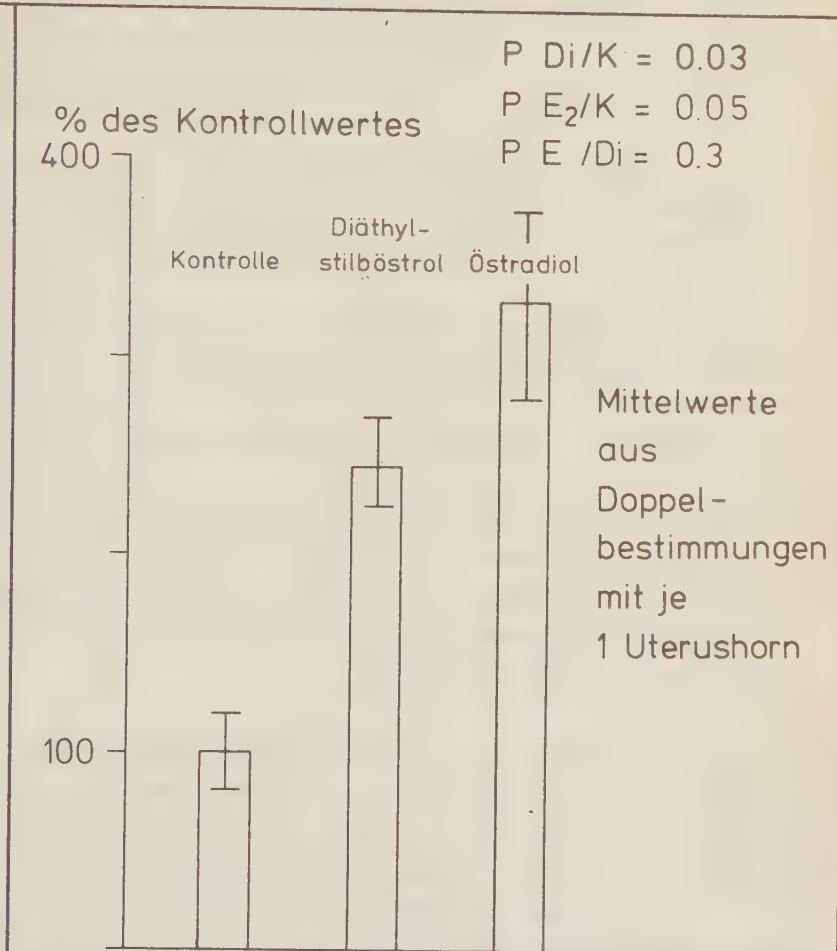
In den Ansätzen mit vorbehandelten Uteri findet man mehr Östron als Oxidationsprodukt als in den Kontroll Ansätzen mit unvorbehandelten Uteri.

Durch die Vorbehandlung mit den östrogen wirksamen Substanzen wird im Uterus ein Enzym induziert, welches Östradiol zu Östron oxydiert. Der Effekt von Diaethylstilböstrol ist nicht so groß wie der von Östradiol.

Die unterschiedlichen Werte bei den einzelnen Substanzen sind darauf zurückzuführen, daß die Tiere zur Zeit der Vorbehandlung nicht das gleiche Cyclus Stadium aufweisen, somit schon zu Beginn eine unterschiedliche Dehydrogenase-Aktivität vorhanden ist.

Abbild. 8: Induktion der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus

Östradiol-Oxidation nach Vorbehandlung der Tiere mit einmal 1 mg/kg Östradiol bzw. Diäthylstilböstrol. 20 Std. nach Vorbehandlung erfolgt Inkubation von 100 mg Uterusschnitten mit $5 \cdot 10^{-6}$ M 1 Östradiol-4- 14 C, 15 Min. bei 37° C.



Im nächsten Versuch soll eine Zeitabhängigkeit der Enzym-Induktion nach der Vorbehandlung untersucht werden.

Eine Enzym-Induktion wird 20 Stunden nach Vorbehandlung nachgewiesen. Das Maximum der Enzym-Induktion kann aber sowohl früher als auch später auftreten. Dies ist aus dem Grunde interessant, da die Bindung von Östradiol im Uterus an Rezeptoren bereits nach zwei Stunden ein Maximum erreicht. Über die Rezeptoren entfaltet Östradiol seine hormonelle Wirkung, wozu unter anderem die Protein-Biosynthese zählt, also auch jede Enzym-Induktion. Der zeitliche Verlauf der Enzym-Induktion gibt Aufschluß über die Schnelligkeit der Hormon-Wirkung.

Die Östrogen-Produktion und die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus ist abhängig vom Cyclus-Stadium der Versuchstiere. Aus diesem Grunde wird eine Woche lang durch tägliche Vaginalabstriche der Cyclus der Versuchstiere kontrolliert.

Die einmalige Vorbehandlung der Tiere erfolgt jeweils im Diöstrus. Ein Teil der Tiere wird mit Östradiol vorbehandelt, ein anderer Teil mit Diäthylstilböstrol. Nach verschiedenen Zeiten werden die Tiere getötet, das Cyclus-Stadium bestimmt und die Uteri mit Östradiol-4-¹⁴C inkubiert.

Das Ergebnis in Abbildung 9 zeigt, daß bei beiden Substanzen eine Enzym-Induktion erfolgt. Das Maximum der Enzym-Induktion liegt bei 40 Stunden nach Vorbehandlung. Wie bereits festgestellt, ist der Effekt von Östradiol größer als von Diäthylstilböstrol. Das mikroskopische Bild der Vaginalabstriche und die starke Durchblutung und Wassereinlagerung des Uterus zeigen an, daß die Uteri durch die Vorbehandlung in das Östrus-Stadium gelangen.

Nach 65 Stunden sinkt die Aktivität der Dehydrogenase wieder auf den Kontrollwert ab.

Die Schwankungen bei den einzelnen Werten sind auf methodische Schwierigkeiten zurückzuführen. Es gelingt bei den Vaginalabstrichen nicht immer, das Cyclus-Stadium einwandfrei zu bestimmen. So werden möglicherweise Tiere vorbehandelt, die sich im späten Metöstrus befinden ebenso wie solche, die sich kurz vor dem Proöstrus befinden.

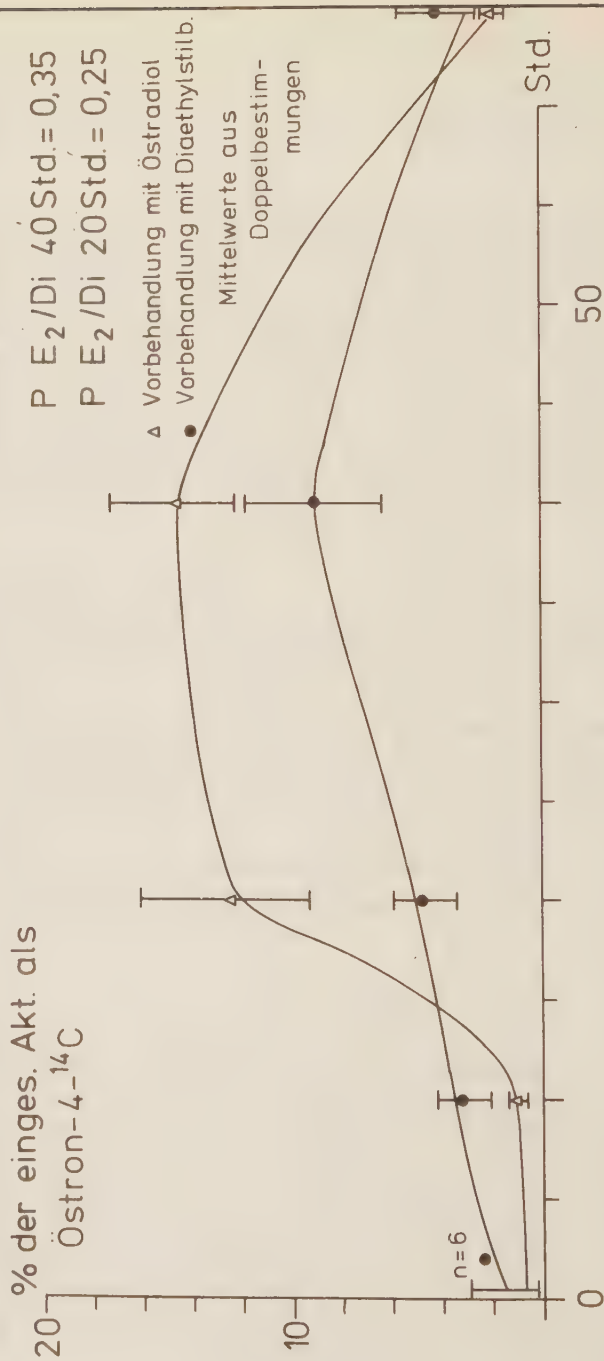
Die Resorption des i. p. gespritzten Östrogens kann unterschiedlich sein, abhängig vom Alter der Tiere und von den Fettdepots, in die lipophile Substanzen gelangen können.

Andererseits ist die pro Tier applizierte Menge so gering, daß wahrscheinlich alles resorbiert und an Serum-Albumin gebunden wird.

Durch die täglichen Cyclus Kontrollen können die Versuchstiere in eine Stress-Situation gelangen, die die hormonalen Regelkreise beeinflußt.

Abbild.9:Induktion der 17 β -OH-ST.DH. im Uterus, Zeitabh.

Erwachsene Rattenweibchen werden einmal mit 1 mg/kg Östradiol od. Diaethylstilböstrol im Diöstrus vorbe-handelt. Nach verschiedenen Zeiten erfolgt die Uteruspräparation und Inkubation mit 100 mg Uterus-Schnitten mit $5 \cdot 10^{-6}$ M/1 Östradiol-4- 14 C, 15 Min. bei 37° C. Nach DC-Trennung erfolgt die quantitative Bestimmung des entstandenen Östrons.



2.4. Besteht eine Abhängigkeit der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase vom Alter der Tiere?

Im ersten Teil der Arbeit geht aus den Versuchsergebnissen hervor, daß auf Grund der verschiedenen Einbau-Raten von Östradiol-6, 7-T und Östradiol-17a-T im Uterus eine enzymatische Östradiol-Oxidation erfolgt. Im letzten Versuch wird festgestellt, daß sich die uterine Östradiol-Dehydrogenase durch Östrogene induzieren läßt. An anderer Stelle (17) wird erwähnt, daß die Hormonkonzentration und die Aktivität der Dehydrogenase miteinander in Beziehung stehen. Aus diesem Grunde soll die Östradiol Oxidation im infantilen Uterus gemessen werden. Hier erfolgt noch keine endogene Östradiol Produktion, welche die uterine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase beeinflussen kann. Es soll untersucht werden, wie sich die Enzym-Aktivität mit zunehmendem Alter der infantilen Ratten ändert.

Jensen geht davon aus, daß im Uterus keine Östradiol-Oxidation erfolgt. Er betont dies besonders für den infantilen Uterus (31, 32). Untersuchungen von Pack et al. (17) ergeben eine Östradiol-Oxidation im erwachsenen, nicht aber im infantilen Uterus. Dagegen stehen Ergebnisse von Wenzel und Mitarbeitern und die Versuche dieser Arbeit (Abbild. 2 - 5), aus denen eine Östradiol-Oxidation auch im infantilen Uterus hervorgeht (33). Da Östron von den Uterus Rezeptoren nicht gebunden wird, beendet eine Östradiol-Oxidation im Uterus die Wirkung des Hormons auf das Erfolgsorgan (9).

Uteri von 19 Tage bis zu 45 Tage alten Rattenweibchen werden mit Östradiol-4-¹⁴C inkubiert und Östron als Metabolit gemessen.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 10 dargestellt:

Im infantilen Uterus erfolgt eine enzymatische Östradiol-Oxidation.

Die Aktivität der Dehydrogenase ist abhängig vom Alter der Versuchstiere.

Mit zunehmendem Alter der Tiere sinkt die Enzymaktivität ab. Sobald die Tiere in den Sexualcyclus gelangen, hängt die Enzymaktivität vom Cyclus-Stadium ab (28). Die endogene Östrogen Produktion reguliert dann die Dehydrogenase-Aktivität.

Diese Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu:

In Abschnitt 2.1. wird die wechselseitige Beziehung zwischen Hormon (Östradiol)-Konzentration und Enzym (Dehydrogenase)-Aktivität erwähnt. Im Diöstrus ist die Konzentration an Rezeptoren am größten. Die Östradiol-Produktion des Ovars steigt vom Diöstrus bis kurz vor dem Östrus an. Damit werden die uterinen Rezeptoren besetzt. Diese Hormon-Rezeptor-Komplexe üben über den Kern-Rezeptor ihre Wirkung aus. Zu diesen Hormonwirkungen zählt die Protein-Biosynthese, somit auch die Bildung von Enzymen. Diese Enzym-Induktion hat ihr Maximum im Östrus.

Einerseits wird durch Östradiol über die Rezeptoren die Dehydrogenase induziert, andererseits durch die Dehydrogenase die Östradiol-Konzentration kontrolliert.

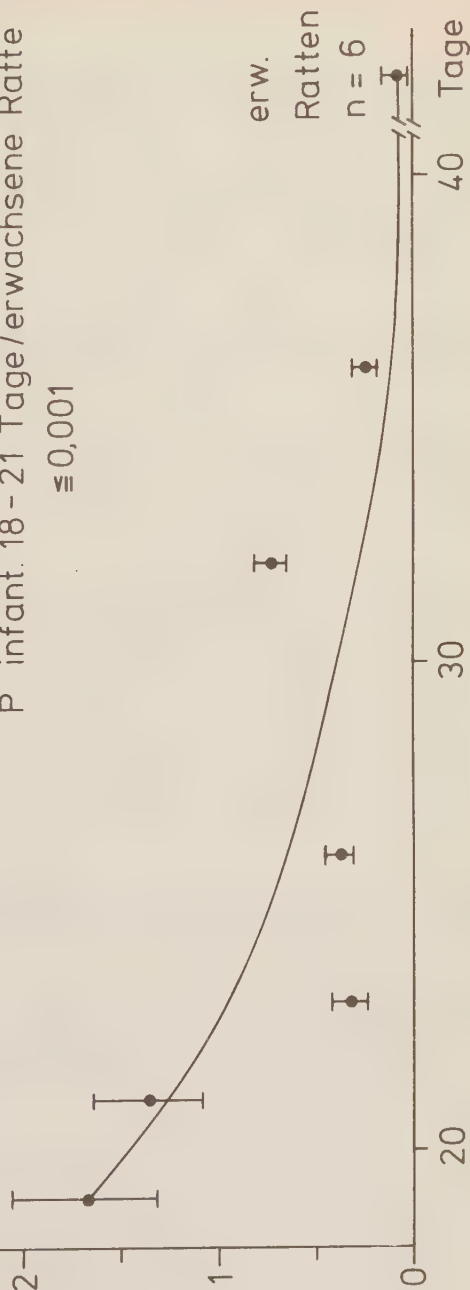
Möglicherweise ist die Rezeptor-Konzentration während des gesamten Cyclus gleich. Sie scheint nur im Diöstrus am größten, da hier durch die geringe endogene Östradiol-Produktion die wenigsten Rezeptor-Stellen besetzt sind.

Abbild.10: Altersabhängigkeit der Akt. der 17β -OH-St.DH.

Uteri von 19 bis 45 Tage alten infantilen Ratten werden mit $5 \cdot 10^{-6}$ M/1 Östradiol-4- 14 C 15 Min. bei 37° C inkubiert. Nach Extraktion der Steroide und DC-Trennung erfolgt die quantitative Bestimmung des entstandenen Östrons als Maß für die Aktivität der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase n = 2

% der einges. Akt. an Östron
pro 10mg Gewebe

P infant. 18 - 21 Tage/erwachsene Ratte
 $\leq 0,001$



2.5. Erfolgt im Uterus eine reversible Östradiol-Oxidation?

Für die Östradiol-Oxidation im Uterus liegen Ergebnisse vor. Unsicherheit besteht über die Umkehrung der Reaktion, über die Reversibilität der Oxidation.

In Versuchen mit menschlichem Endometrium (34) wird eine Oxidation von Östradiol und eine Reduktion von Östron gefunden.

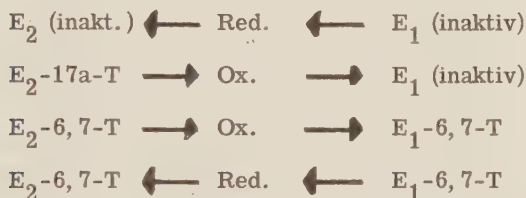
Bei physiologischen pH Werten ist nach Talalay (35) auf Grund der Gleichgewichtskonstanten der Red-Ox Reaktion eine reversible Östradiol-Oxidation möglich.

Wie erwähnt (31, 32), findet Jensen keine Anzeichen für eine Östradiol-Oxidation im Rattenuterus. Nach Injektion von Östron findet er aber Östradiol als Reduktionsprodukt. Er stellt die Behauptung auf, daß Oxidation und Reduktion von einer uterinen Dehydrogenase katalysiert werden. Dabei liegt das Gleichgewicht der Reaktion unter physiologischen Bedingungen ganz auf der Seite von Östradiol. Aus diesem Grunde findet man eine Östron-Reduktion, nicht aber eine Östradiol-Oxidation.

Dieses Problem soll im nächsten Versuch geklärt werden. Dazu dient folgende Überlegung: Östradiol-17a-T hat in 17-Stellung das Wasserstoff-Isotop Tritium mit der Massezahl 3. Dadurch ist die Reaktionsfähigkeit gegenüber Östradiol-6, 7-T mit normalem Wasserstoff am C-17 verändert. Durch diesen Isotopie-Effekt reagiert Östradiol-17a-T langsamer als Östradiol-6, 7-T.

Behandelt man Tiere mit einer Mischung von Östradiol-17a-T und Östradiol-6, 7-T, so ist also bei einer Oxidation am C-17 zu erwarten, daß Östradiol-17a-T langsamer oxydiert wird als Östradiol-6, 7-T. Am Ende der Reaktion wird also mehr Östradiol-17a-T vorliegen als Östra-

diol-6, 7-T, da dieses schneller oxydiert wird. Es wird sich das Verhältnis von Östradiol-17a-T zu Östradiol-6, 7-T zugunsten von Östradiol-17a-T ändern. Ist die Reaktion reversibel, wird also Östron wieder zu Östradiol reduziert, ändert sich das Verhältnis Östradiol-17a-T zu Östradiol-6, 7-T zugunsten von Östradiol-6, 7-T. Aus Östron-6, 7-T wird durch Reduktion Östradiol-6, 7-T, aber aus inaktivem Östron, durch Oxidation von Östradiol-17a-T entstanden, wird durch Reduktion mit inaktivem Wasserstoff inaktives Östradiol.



Es gibt drei Möglichkeiten für das Versuchsergebnis:

1. Die wiedergefundene Östradiol-17a-T - Östradiol-6, 7-T Relation ist die gleiche wie bei der Injektion: es ist keine Oxidation erfolgt.
2. Das wiedergefundene Verhältnis hat sich zugunsten von Östradiol-17a-T geändert: es ist eine nicht reversible Oxidation erfolgt.
3. Nach der Reaktion hat sich das Verhältnis zugunsten von Östradiol-6, 7-T geändert: es hat eine reversible Oxidation stattgefunden.

Eine Mischung von Östradiol-17a-T und Östradiol-6, 7-T in einem bekannten prozentualen Verhältnis wird infantilen Rattenweibchen injiziert. Zwei Stunden nach Injektion werden die Tiere getötet, die Uteri präpariert und die Steroide extrahiert. Um eine Oxidation des radioaktiven Östradiols durch äußere Umstände zu vermeiden, wird den Ansätzen vor dem Homogenisieren und der Extraktion ein 100-facher Überschuß an inaktivem Östradiol zugesetzt. Durch Oxidation des noch vorhandenen Östradiols wird wiederum das Verhältnis Östradiol-17a-T zu Östradiol-6, 7-T bestimmt. Das Tritium aus Östradiol-17a-T findet man als HTO in der wässrigen Phase, das entstandene Östron-6, 7-T in der organischen Phase.

Die genaue Versuchsdurchführung wird in Methodik beschrieben.

Aus dem Versuchsergebnis gemäß Abbildung 11 geht hervor, daß

1. unter in vivo Bedingungen im Uterus eine Östradiol Oxidation erfolgt,
2. daß die Oxidation unter den gewählten Bedingungen nicht reversibel verläuft.

Die nicht reversibel verlaufende Oxidation stimmt mit der Literatur überein (36).

Unter den gewählten Bedingungen wird keine reversible Oxidation gefunden. Man kann sich aber der Vorstellung von Talalay und Jensen anschließen, wonach die Gleichgewichtslage der Reaktion von der Konzentration an Östradiol oder Östron abhängig ist.

Es erscheint auch sinnvoll, daß eine uterine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase oder Oxidoreduktase beide Reaktionen katalysiert. Diese Erklärung stimmt mit den Befunden überein, daß Östron eine geringe östrogene Wirkung hat. Diese Wirkung wird in Zusammenhang gebracht mit der Reduktion des Östrons zu Östradiol (37).

Abbild. 11: Reversible E₂-Oxidat. im infant. Uterus

Eine Mischung von E₂-17a-T und E₂-6, 7-T entspr. 0, 4 μ g in einem bekannten prozentualen Verhältnis wird infantilen Rattenweibchen i. p. injiziert. Nach 2 Std. erfolgt Uteruspräparation, Extraktion der Steroide und DC-Trennung. Das Östradiol wird oxydiert und der prozentuale Anteil an E₂-17a-T und E₂-6, 7-T ermittelt.

Experim.	eingesetzte Aktivität			wiedergef. Aktivität	Analyse der wiedergefundenen Aktivität					
	$E_2-17a-T$ μ Ci	$E_2-6, 7-T$ μ Ci	$\frac{E_2-17a-T}{E_2-6, 7-T}$		% der einges. Aktiv. μ Ci	davon als HTO μ Ci	davon in org. Phase μ Ci	Summe		Quotient $\frac{E_2-17a-T}{E_2-6, 7-T}$
								μ Ci	%	
1	39	141	0.28	0.09	0.05	0.01	0.006	0.016	32	1.667
2	39	141	0.28	0.081	0.045	0.013	0.0057	0.019	23.5	2.28
3	92	238	0.39	0.06	0.018	0.027	0.002	0.029	48.5	13.5
4	92	238	0.39	0.07	0.021	0.029	0.0026	0.031	44.5	11.5

2.6. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse.

In drei Versuchen wird die Anwesenheit einer 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus als Östrogen-Erfolgsorgan nachgewiesen:

Die Dehydrogenase läßt sich durch Vorbehandlung mit Östrogenen induzieren.

Die Aktivität der Dehydrogenase hängt vom Alter der Tiere ab, im infantilen Uterus ist die Enzym-Aktivität höher als im Uterus erwachsener Ratten.

Das Gleichgewicht der von der Dehydrogenase katalysierten Reaktionen liegt auf der Seite von Östron, es erfolgt keine reversible Oxidation.

Aus folgenden Gründen erscheint die Anwesenheit einer 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus sinnvoll:

Im Ovar erfolgt die Bildung des Hormons Östradiol. Die Östrogen-Produktion unterliegt cyclischen Schwankungen. Das Östradiol gelangt durch das Blut an Serum-Proteine gebunden in den Uterus. Dort erfolgt die Bindung an spezielle Östrogen-Rezeptoren. Der größte Teil des gebildeten oder zugeführten Östradiols, das nicht im Uterus gebunden ist, gelangt in die Leber, wo es metabolisiert wird. Im Uterus sorgt die Östradiol Dehydrogenase durch Oxidation des einmal aufgenommenen Östradiols für die Beendigung der Hormonwirkung. Auf diese Weise wird ein Überangebot an Östradiol im Uterus verhindert.

Von Cronholm (38) liegen Arbeiten vor über Faktoren, die das Verhältnis von -17-OH und -17-Keto-Steroiden beeinflussen. Durch Anwendung von Äthanol findet er über ein verändertes Verhältnis der Co-Enzyme NAD/NADH eine Verschiebung des Red-Ox Gleichge -

wichtiges von Steroiden. Es kann als sinnvoller Regelmechanismus verstanden werden, daß im Zielorgan eine enzymatische Kontrolle des Hormonspiegels stattfindet.

Die Möglichkeit der Enzym-Induktion der Dehydrogenase ist ein Beispiel dafür, wie eng die Kontrolle des Hormons Östradiol über biochemische Vorgänge in der Zelle, z. B. die Enzymaktivität, und die Kontrolle des Enzyms über die Östradiol Konzentration miteinander verbunden sind. Im infantilen Uterus ist die Aktivität der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase größer als im erwachsenen Uterus. Analog sind die Angaben in der Literatur (6) über die Östrogen-Rezeptoren. Im infantilen Uterus ist die Rezeptor Konzentration größer als im erwachsenen Uterus. Eine Deutung dieser Tatsache ist folgendermaßen möglich:

Die hohe Dehydrogenase Aktivität stellt für das infantile Organ eine Schutzfunktion dar gegenüber der Einwirkung von Östrogenen. Durch Oxidation zu Östron verliert das Steroid seine hormonelle Wirkung und wird ausgeschieden.

Wie erwähnt, ist die fehlende reversible Oxidation im Uterus unter physiologischen Bedingungen kein Anzeichen dafür, daß nicht prinzipiell eine reversible Östradiol Oxidation stattfinden kann (37). Die Lage des Gleichgewichtes wird bestimmt durch die Konzentration an 17-OH und 17-Keto Steroid.

In einer Arbeit von De Hertogh et al. (39) werden Gleichgewichtskonstanten von Östradiol und Östron in verschiedenen Organen untersucht. Im Uterus findet er eine Bevorzugung von Östradiol. Untersuchungen von Wenzel (unveröffentlicht) beschäftigen sich mit dem Einfluß verschiedener Keto- und -OH- Steroide und anderer Verbindungen auf dieses Red-Ox Verhältnis von Östradiol und Östron. Von dem Red-Ox Paar Östradiol/Östron wird im Uterus fast ausschließlich Östradiol gebunden.

Wie bereits erwähnt, zeigt auch Östron eine geringe Affinität zum Uterus und eine geringe östrogene Wirkung. Diese ist möglicherweise auf eine Reduktion zu Östradiol zurückzuführen. Da sich das Red-Ox-Verhältnis dieser Steroide beeinflussen läßt, ergibt sich theoretisch die Möglichkeit, die östrogene Wirkung von Östradiol zu vermindern und die östrogene Wirkung von Östron zu steigern.

Nicht endgültig geklärt ist die Frage, wann die Oxidation von Östradiol im Uterus erfolgt. Es bleibt offen, ob am Rezeptor gebundenes Östradiol oxydiert wird oder freies Östradiol. Aus den Versuchsergebnissen mit dem SH-Blocker kann man interpretieren, daß Rezeptor gebundenes Östradiol nicht oxydiert wird. Für die Richtigkeit der Annahme sprechen folgende Versuchsergebnisse, die hier nicht näher dargestellt sind:

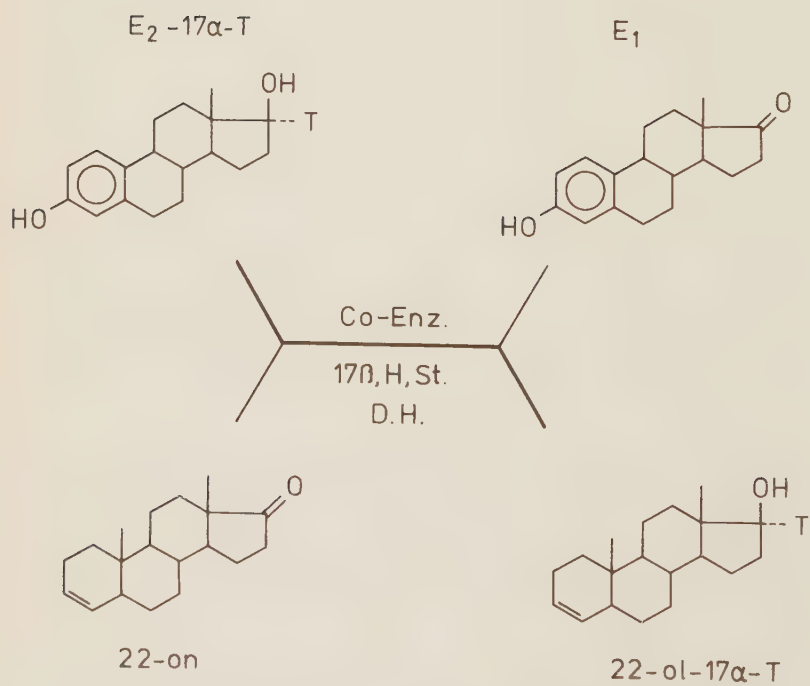
Wird Uterus Gewebe nach in vivo Bindung von Östradiol-17a-T inkubiert, läßt sich im Inkubationsüberstand HTO nachweisen. Wird dem Inkubationsansatz Leberhomogenat zugefügt, steigt die HTO Bildung. In Gegenwart von Lebergewebe verbleibt mehr Aktivität im Gewebe als mit Uterusgewebe allein. Der Anteil an Radioaktivität, der nicht als HTO vorliegt, ist in den Ansätzen mit Lebergewebe niedriger. Aus diesen Befunden kann man folgende Theorie aufstellen:

Es erfolgt keine Oxidation des an Rezeptor gebundenen Östradiols. Nach Abdissotiation vom Kern Rezeptor kann das Östradiol oxydiert werden. Die unspezifische Proteinbindung von Östradiol im Lebergewebe schützt das Molekül vor oxydativen Angriffen. Verallgemeinernd kann man sagen:

Besteht eine Bindung eines Moleküls zu einem Makromolekül, kann es nicht durch enzymatische Reaktionen angegriffen werden.

Es liegen Untersuchungen vor von Breuer und Mitarbeitern (40) über die Wirkung von Plasma Proteinen auf die enzymatische Oxidation von Östradiol und Testosteron. Sie führen zu dem Ergebnis, daß die Protein-Bindung das Substratmolekül vor einem enzymatischen Angriff schützt. Diese Ergebnisse weisen in die gleiche Richtung wie die oben dargelegte Theorie.

Tritium Transfer

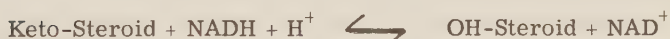
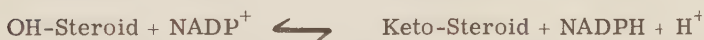


3. Beeinflussung der Östradiol-Oxidation durch ein reduzierbares Keto-Steroid, Mechanismus des Tritium-Transfers

3.1. Einleitung und Literaturübersicht

Die vorhergehenden Abschnitte haben die Möglichkeit einer Östradiol-Oxidation im Uterus nachgewiesen. Der folgende Abschnitt soll klären, ob diese Oxidation durch ein 2. Steroid beeinflusst werden kann.

Zu Beginn der Arbeit wird auf Untersuchungen von Talalay hingewiesen, in denen Östradiol die Fähigkeit zugeschrieben wird, einen Wasserstoff-Transfer von einem Co-Enzym auf das andere (NADP - NAD) zu bewirken (25, 41).



Diese Transhydrogenase-Reaktion wird von Karavolas (42) aufgegriffen und bestätigt. Danach dient Östradiol in katalytischen Mengen als Initiator der Wasserstoff-Übertragung zwischen NADPH und NAD. Dabei wird Östradiol oxydiert und entstehendes Östron wieder reduziert. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein zwischen der reduzierten und der oxydierten Form. In diesem Zusammenhang wird nachgewiesen, daß die

Transhydrogenase-Funktion nicht identisch ist mit der Dehydrogenase-Reaktion (24).

Untersuchungen von Wenzel et al. basieren auf der Überlegung, daß das Red-Ox Verhältnis von Östradiol und Östron durch Zugabe eines oxydierbaren Hydroxy-Steroids beeinflußt werden kann.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß das Tritium vom Östradiol-17a-T bei der Oxidation des Moleküls über das Co-Enzym auf ein reduzierbares Keto-Steroid, einen Acceptor, übergehen kann.

Dieser Tritium Transfer ist Gegenstand ausführlicher Untersuchungen:

Wenzel und Pollow finden, daß Östradiol-17a-T ein bevorzugter Wasserstoff-Donator gegenüber anderen NAD(P)H erzeugenden Substraten ist (43, 44).

Wenzel und Mützel untersuchen diesen Tritium-Transfer mit einem biologisch unwirksamen Steroid als Acceptor, dem 5a-Androst-3en-17-on (45). Diese Substanz erweist sich als ausgezeichneter Acceptor für das Tritium von Östradiol-17a-T. Untersuchungen über dieses Steroid hinsichtlich der Donator- und Acceptor-Qualitäten und der biologischen Wirksamkeit liegen vor von Goedecke (Diss. Goed. 73 FU Berlin). Wenzel und Hieronimus (46) weisen nach, daß auch ein 20-Keto-Steroid als Acceptor des Tritiums vom Östradiol-17a-T fungieren kann.

Das wasserstoff-transferrierende Enzym wird von Wenzel und Wolf beschrieben (47). Ebenfalls Pollow (48) bringt Ergebnisse über Untersuchungen des Wasserstoff-transferrierenden Enzyms zwischen Östradiol und Androgenen.

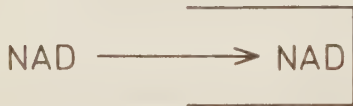
Anknüpfend an die bislang vorliegenden Ergebnisse sollen folgende Punkte untersucht werden:

1. Erfolgt auch im Uterus ein Tritium-Transfer ?
2. Nach welchem Mechanismus verläuft der Tritium-Transfer in der Leber ?
3. Sind auch andere oxydierbare Substrate in der Lage, einen T-Transfer auf ein Acceptor-Steroid zu bewirken ?
4. In welcher Weise beeinflußt das Acceptor-Steroid die Östradiol-Oxidation bzw. den Weg des Tritiums vom Östradiol ?

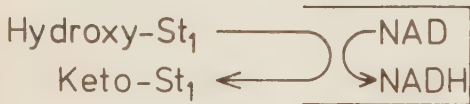
Abbild.12: Reaktionen an der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Ursache für den bevorzugten T-Transfer zwischen Steroiden:

Langsame NAD-T-Dissotiation von der 17 β -OH-Steroid-Dehydrogenase



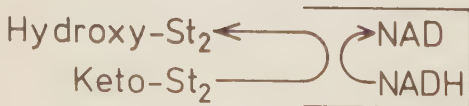
17 β -OH-Steroid
Dehydrogenase



schneller Austausch
der Steroide



langsamer Austausch
des gebundenen
NADH



schneller Austausch
von Keto- und
Hydroxy-Steroid

3.2. Co-Enzym-Spezifität der Östradiol-Oxidation und des Tritium-Transfers

Der von Wenzel und Mitarbeitern gefundene Tritium-Transfer zwischen Östradiol-17a-T und einem Acceptor-Steroid verläuft wie die Östradiol-Oxidation enzymatisch. Als Co-Enzyme für diese Reaktionen fungieren die wasserstoffübertragenden Pyridin-Nucleotide. Bislang ist nicht endgültig geklärt, ob die Oxidation und der Tritium-Transfer von der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase katalysiert werden. Es wird auch die Anwesenheit einer speziellen Tritium Transferrase in Erwägung gezogen (48, 49). Die Vorstellung einer strengen Kompartimentierung der Enzyme bzw. Co-Enzyme in der Zelle dient als Erklärung für den bevorzugten Tritium-Transfer zwischen Steroiden (47).

Die eigenen Versuche sollen folgende Fragen klären:

1. In welchen Fraktionen laufen nach Auftrennung des Leberhomogenates in Cytoplasma und Mikrosomenfraktion die enzymatische Östradiol-Oxidation und der Tritium-Transfer ab?
2. Welchen Einfluß hat die Anwesenheit der Co-Enzyme NAD und NADP auf diese enzymatischen Prozesse?
3. Besteht eine Parallelität zwischen Östradiol Oxidation und Tritium Transfer?

Aus weiblichem Rattenleberhomogenat wird durch Zentrifugation eine Cytoplasma- und eine Mikrosomenfraktion gewonnen. In den einzelnen Fraktionen wird eine Proteinbestimmung durchgeführt durch photometrische Messung bei 210 nm gegen ein Standard Serum.

Cytoplasma und Mikrosomen werden nebeneinander inkubiert mit $1,2 \cdot 10^{-3}$ M/l NAD oder NADP oder ohne Zusatz von Co-Enzym. Gemessen wird jeweils die Östradiol-Oxidation mit 10^{-5} M/l Östradiol-4- ^{14}C als Substrat und der Tritium-Transfer mit 10^{-5} M/l Östradiol-17a-T und $2,5 \cdot 10^{-5}$ M/l an Acceptor-Steroid.

Nach Extraktion der Steroide aus den Inkubationsansätzen und DC der Metabolite erfolgt die quantitative Bestimmung mit dem Dünnschicht-Scanner.

Die Darstellung der Werte in Abbildung 13 zeigt Folgendes auf:

1. Die Enzymaktivität pro mg Protein ist im Cytoplasma um den Faktor 100 niedriger als in der Mikrosomenfraktion. Die Hauptaktivität des Enzymsystems der Östradiol-Oxidation und des Tritium-Transfers ist also in der Mikrosomenfraktion lokalisiert. Eine geringe Enzymaktivität ist auch im Cytoplasma vorhanden, der Tritium-Transfer liegt noch niedriger als die Oxidation.
2. Das Ergebnis zeigt, daß eine Co-Enzym Spezifität für die gemessenen Reaktionen besteht. Der Effekt von NAD und NADP ist gleich groß. In der Mikrosomenfraktion wird der Umsatz durch Zugabe der Co-Enzyme NAD oder NADP um mehr als das 10-fache gesteigert.

Im Cytoplasma wird die Oxidation durch Zusatz von Co-Enzym im Höchstfall um das Doppelte gesteigert, der Tritium Transfer etwas mehr, wobei aber im Vergleich zu den Mikrosomen der Umsatz auch mit Co-Enzym niedrig liegt.

Erstaunlich ist, daß im Cytoplasma auch ohne Zusatz von Co-Enzym eine Oxidation stattfindet.

Daraus leitet sich die logische Erklärung für diese Befunde ab:

In Leberhomogenat laufen die Oxidation und der Tritium-Transfer auch ohne Zugabe von Co-Enzym ab, weil alle Zell-Substrate noch vorhanden sind, der Umsatz läßt sich aber durch die Co-Enzyme steigern.

Wird nun das Homogenat fraktioniert in eine Cytoplasma- und eine Mikrosomenfraktion, so verbleiben die vorhandenen Co-Enzyme in der wässrigen cytoplasmatischen Phase, und auch Reste von Co-Enzym werden durch die Waschvorgänge aus der Mikrosomenfraktion ausgewaschen.

Daraus ergibt sich eine enzymatische Oxidation im Cytoplasma auch ohne Co-Enzym-Zusatz.

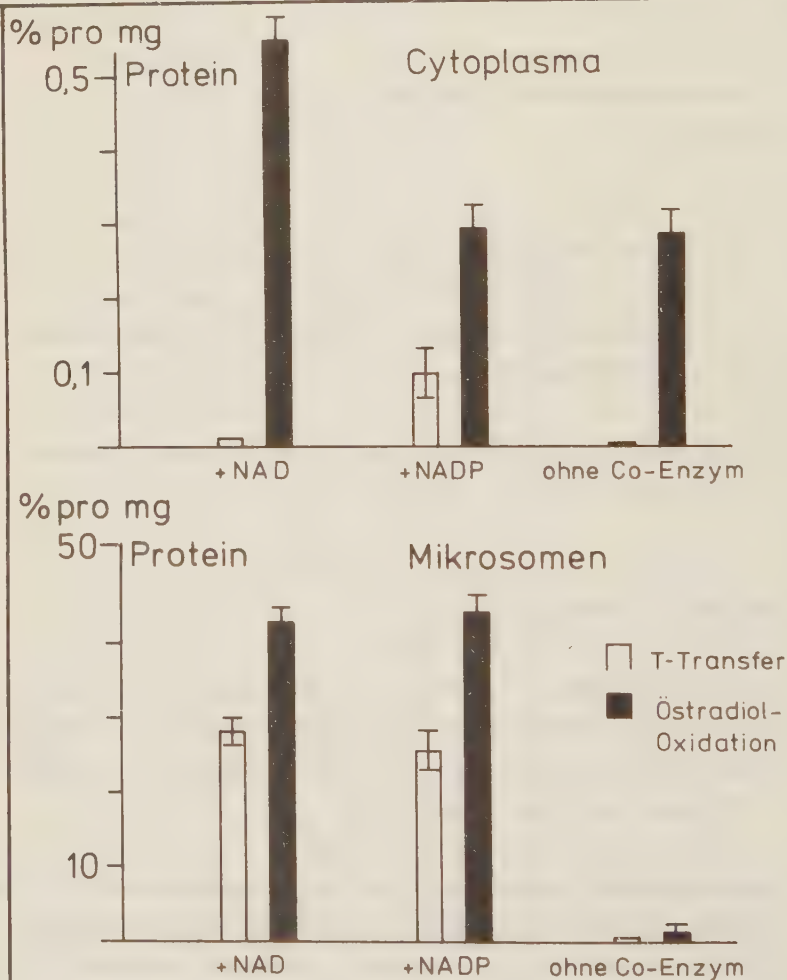
3. Es besteht eine Parallelität zwischen Östradiol Oxidation und Tritium-Transfer.

Der Tritium-Transfer läuft wie die Oxidation in der gleichen Größenordnung in der Mikrosomenfraktion ab. Da neben dem T-Transfer auch noch HTO gebildet wird (Werte nicht dargestellt), liegt der T-Transfer niedriger als die Oxidation.

Im Cytoplasma ist der Unterschied zwischen Oxidation und Tritium-Transfer größer. Das liegt daran, daß durch die Vielzahl anderer gelöster Red-Ox Enzyme reduziertes Co-Enzym abgefangen wird, so daß es keinen Acceptor reduzieren kann.

Abbild.13:Co-Enzym-Spezifität des T-Transfers und der Östradiol-Oxid.

Mikrosomen und Cytoplasma aus weibl. Rattenleber werden inkubiert mit $1,2 \cdot 10^{-5}$ M/1 NAD oder NADP bzw. ohne Co-Enzym 15 Min. bei 37° C mit 10^{-5} M/1 $E_2-4-^{14}C$ bzw. $E_2-17a-T$ und $2,5 \cdot 10^{-5}$ M/1 5a-Androst-3en-17on $n = 2$



3.3. Mechanismus des Tritium-Transfers in der Leber, Zeitabhängigkeit und Vorinkubation vor Acceptor-Zugabe

Der erste Schritt bei der enzymatischen Östradiol-Oxidation ist die Bildung von reduziertem Co-Enzym (NADH NADPH). Das Co-Enzym ist am Enzymprotein gebunden. Bietet man dieser Reaktion ein reduzierbares Keto-Steroid an, welches auf Grund seiner Molekülstruktur ähnlich wie das Substrat Östradiol zur Enzymoberfläche paßt, so kann das reduzierte Co-Enzym seinen Wasserstoff auf dieses Acceptor-Steroid übertragen. Ist aber kein reduzierbares Steroid zugegen, dissoziiert das reduzierte Co-Enzym vom Enzymprotein ab und stellt seinen Wasserstoff anderen reduktiven Reaktionen zur Verfügung.

Es soll untersucht werden, ob sich der Tritium-Transfer von Östradiol-17a-T auf 5a-Androst-3en-17-on verringert, wenn der Zeitraum vergrößert wird zwischen der Inkubation von Östradiol-17a-T und der Zugabe des Acceptor-Steroids zum Inkubationsansatz.

Weibliche Rattenlebermikrosomen werden mit Östradiol-17a-T vorinkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wird das Acceptor Steroid zum Inkubationsansatz gegeben. Nach der Hauptinkubation erfolgt die Bestimmung der Reaktionsprodukte und des verbliebenen Östradiols.

Das Versuchsergebnis bestätigt die Richtigkeit der Überlegungen: Donator- und Acceptor-Steroid müssen gleichzeitig inkubiert werden, damit ein maximaler Tritium-Transfer erfolgen kann. Ein Unterschied von einigen Minuten zwischen Donator- und Acceptor-Zugabe bewirkt, daß kaum noch ein Tritium-Transfer stattfindet.

Das gebildete NADT wird erst nach seiner Dissotiation von der Steroid-Dehydrogenase zu HTO oxydiert. Vgl. Abbildung 14.

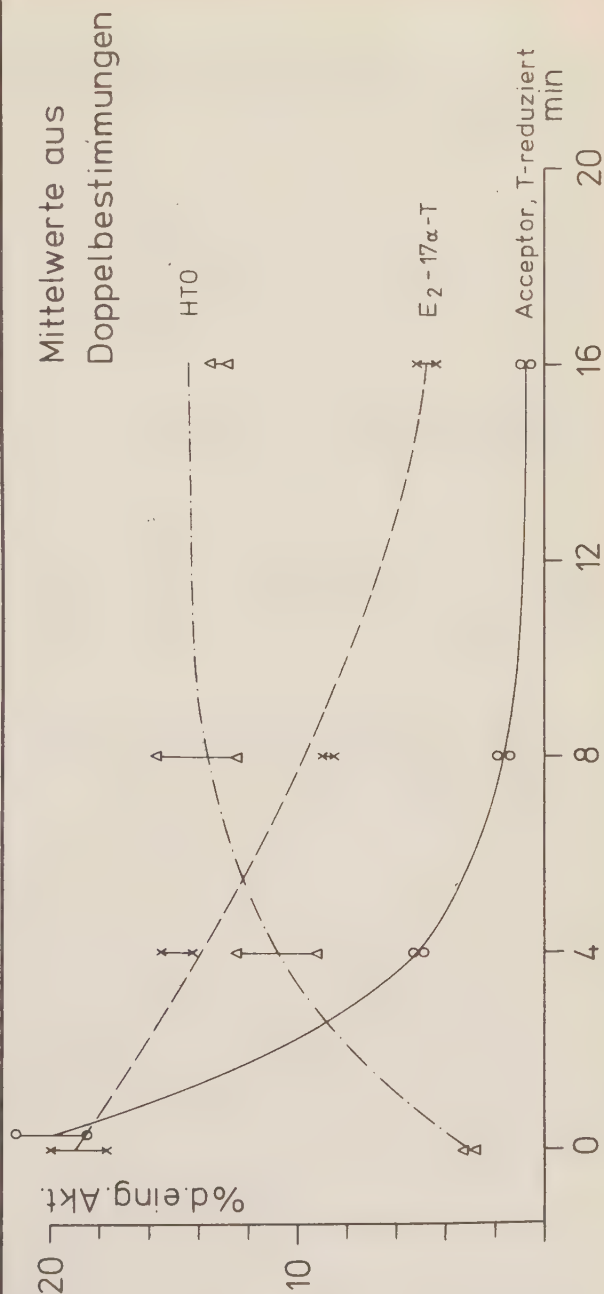
Voraussetzung für diesen Reaktionsmechanismus ist, daß die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase identisch ist mit dem Wasserstoff-transferierenden Enzym. Sollten es zwei verschiedene Enzyme sein, müßten sie räumlich sehr eng benachbart sein und strukturell sehr ähnlich sein. Es besteht an Hand dieser Ergebnisse keine andere Möglichkeit, die hohe Spezifität des Tritium-Transfers zu erklären.

In einem Kontroll-Versuch wird eine Inkubation statt mit Lebermikrosomen durchgeführt mit einer 3, 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Enzymsuspension (SIGMA Chemical Company St. Louis). Es erfolgt eine Östradiol-Oxidation und ein Tritium Transfer von Östradiol-17a-T auf 5 α -Androst-3en-17-on. 5 % der eingesetzten Aktivität werden als reduzierter Acceptor wiedergefunden (Werte nicht dargestellt).

Damit ist geklärt, daß die Tritium-Transfer-Reaktionen zwischen Steroiden am gleichen Enzymprotein ablaufen wie die Oxidation am C-17.

Abbild.14: T-Transfer bei verzögerter Acceptor Zugabe

Weibl. Rattenlebermikrosomen $\pm$ 50 mg Feuchtgew. werden vorinkubiert mit 10^{-6} M/1 Östradiol-17 α -T und $5 \cdot 10^{-6}$ M/1 NAD. Nach 0, 4, 8 und 16 Min. wird 10^{-4} M/1 5 α -Androst-3en-17on zugegeben. Hauptinkubation: 5 Min. 37° C. Anschließend Extraktion der Steroide und DC-Trennung. HTO Bestimmung aus den Inkubationsüberständen.



3.4. Versuch eines Tritium-Transfers von oxydierbaren Nicht-Steroid-Substraten auf ein reduzierbares Acceptor-Steroid

Wenzel und Wolf (47) führen Versuche durch, um das Tritium vom Östradiol-17a-T auf andere reduzierbare Substrate wie 2-Oxo-Glutarat und Pyruvat zu übertragen. Die Ergebnisse zeigen, daß zwar eine Reduktion der Substrate mit inaktivem Wasserstoff erfolgt, nicht aber ein Tritium-Transfer von Östradiol-17a-T auf die angebotenen Nicht-Steroid-Acceptoren.

Ein Tritium-Transfer von Östradiol-17a-T auf Nicht-Steroid-Acceptoren findet nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß statt (47).

Tritium-Transfer-Reaktionen von Steroiden auf Nicht-Steroide sind mit negativem Ergebnis durchgeführt worden. Interessant ist nun die Umkehrung der Reaktion, der Tritium Transfer von Nicht-Steroiden auf Steroide.

In diesem Versuch soll ein Tritium-Transfer von oxydierbaren Nicht-Steroid-Donatoren wie Laktat-2-T und Glukose-1-T auf ein Acceptor-Steroid gemessen werden.

Folgendes Ergebnis sollte man erwarten:

Erfolgt die Inkubation zunächst nur mit dem Donator, so bildet sich bei der enzymatischen Oxidation reduziertes Co-Enzym, welches von der entsprechenden Dehydrogenase abdissoziieren kann. Nach einiger Zeit gelangt das reduzierte Co-Enzym an die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Ist nun ein reduzierbares Keto-Steroid anwesend, so erfolgt eine Reduktion des Moleküls.

Beim Tritium-Transfer zwischen Steroiden sinkt mit zunehmender Zeit der Vorinkubation der Anteil an Tritium-reduziertem Acceptor, da eine Dissoziation des Co-Enzyms vom Enzymprotein erfolgt.

Beim Tritium-Transfer von Nicht-Steroiden auf Steroide müßte nach längerer Vorinkubation der Anteil an reduziertem Acceptor steigen oder zumindest nicht kleiner werden, da eine Wanderung des Co-Enzyms von einem Enzym zum anderen erfolgt.

Die Versuche werden nach dem gleichen Schema durchgeführt wie beim Tritium-Transfer von Donator-Steroid auf ein Acceptor-Steroid. Rattenlebermikrosomen werden mit Laktat-2-T vorinkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wird das Acceptor-Steroid hinzugegeben. Die Aufarbeitung der Ansätze erfolgt wie in Methodik beschrieben.

Die Versuche mit Laktat-2-T ergeben einen Tritium-Transfer auf 5 α -Androst-3en-17on in der Größenordnung kleiner als 0,1 %.

Im nächsten Versuch wird folgende Fehlermöglichkeit berücksichtigt:

Laktat-2-T bildet bei der enzymatischen Oxidation die stereoisomere A-Form der Pyridinnucleotide NAD und NADP. Zur Reduktion der 17-Keto Gruppe des Acceptor-Steroids ist jedoch die B-Form des reduzierten Co-Enzyms nötig (49). Es ist möglich, durch Herabsetzung der Co-Enzym Konzentration dieses Problem der Stereospezifität zu umgehen, indem dann die A-Form und die B-Form der Pyridinnucleotide entsteht (50).

Durch diese Änderung wird kein besseres Ergebnis erzielt. Werte kleiner als 0,1 % werden mit der verwendeten Meßanordnung nicht gemessen.

Bei der Oxidation der Glukose entsteht die B-Form von NAD(P). Im nächsten Versuch wird Glukose-1-T als Tritium-Donator verwendet.

Aus Glukose-1-T wird mit der Hexokinase-Reaktion Glukose-1-T-6P hergestellt. In dieser Form läßt sich die Glukose mit Glukose-6-P-Dehydrogenase oxydieren und liefert NAD(P)H.

Die Versuche mit Glukose werden nach dem gleichen Schema durchgeführt wie bei Laktat.

Auch bei Verwendung von Glukose-1-T als Tritium-Donator erfolgt praktisch kein Tritium-Transfer auf das Acceptor-Steroid, d. h. ebenfalls Werte kleiner als 0,1 %.

Auch die Änderung verschiedener Versuchsparameter bringt kein anderes Ergebnis.

Alle diese "Fehler" sind bedingt durch unzureichende Methodik.

Die Meßgenauigkeit des Dünnschicht-Scanners ist begrenzt. Dadurch lassen sich bei der qualitativen und quantitativen Auswertung Werte dieser Größenordnung nur abschätzen.

Wie im Kapitel Methodik beschrieben, erfolgt die Trennung der Metabolite über DC. In Höhe des RF-Wertes des reduzierten Acceptors wird kein Maximum an Radioaktivität gemessen. Nach dem Ansprühen der Platten mit Äthanol-Schwefelsäure werden dunkle Flecken sichtbar, die in Farbe und RF-Wert mit der Referenz Substanz übereinstimmen.

Daraus kann man folgern, daß kein Tritium Transfer von Glukose-1-T auf 5a-Androst-3-en-17on stattfindet, wohl aber eine Reduktion des Acceptor-Steroids mit inaktivem NADPH erfolgt.

Um dieses Ergebnis zu erhärten, werden folgende Reaktionen nebeneinander durchgeführt:

1. Tritium-Transfer Glukose-1-T auf 5a-Androst-3en-17on,
2. Wasserstoff-Transfer Glukose (inaktiv) auf 5a-Androst-3en-17on-4-¹⁴C.

Dabei wird kein Tritium-reduziertes Reaktionsprodukt gefunden. Bei Verwendung von ¹⁴C-markierter Acceptor-Substanz lassen sich auf der Platte 40 % der eingesetzten Aktivität als 5a-Androst-3en-17ol-4-¹⁴C als Reduktionsprodukt nachweisen. Das durch inaktiven Wasserstoff reduzierte inaktive Acceptor-Steroid wird durch Ansprühen auf der Platte sichtbar gemacht.

Bei dem Versuch des Tritium-Transfers von Glukose-1-T auf 5a-Androst-3en-17on taucht ein Problem auf, das kurz erörtert werden soll:

Auf den Scanner-Diagrammen bei den Versuchen mit NADP als Co-Enzym liegt mit niedrigerem RF-Wert als der erwartete reduzierte Acceptor ein radioaktives Maximum. Dieser Peak taucht bei Verwendung von NAD nicht auf. Auch bei Verwendung von Östradiol-17a-T als Tritium-Donator liegt an dieser Stelle keine Radioaktivität. Der entstandene Metabolit wird nicht identifiziert. Man kann vermuten, daß die Doppelwirkung in Ring A des Acceptor-Steroids hydriert wird. Dies stimmt überein mit früheren Ergebnissen (47), wonach mit Glukose-1-T und NADP als Co-Enzym neben einer Reduktion der 17-Keto Gruppe auch die Doppelbindung im Ring A des Steroid Moleküls reduziert wird.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Sowohl der Tritium-Transfer von Steroiden auf Nicht-Steroide als auch der Tritium-Transfer von Nicht-Steroid-T-Donatoren auf 17-Keto-Steroide verlaufen nicht oder nicht in annähernder Größenordnung.
2. Der Tritium-Transfer zwischen Steroiden verläuft am gleichen Enzym-Protein wie die Oxidation an C-17, der 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenas

3.5. Tritium-Transfer von Östradiol-17a-T auf 5a-Androst-3en-17on im Uterus

Identifizierung des Metaboliten

Im ersten Kapitel wird der Einbau von Östradiol-6,7-T bzw. Tritium aus Östradiol-17a-T im Uterus untersucht. Es stellt sich heraus, daß der Einbau von Östradiol und der Einbau von Tritium nicht parallel verlaufen. Daraus wird der Schluß gezogen, daß eine chemische Veränderung am Östradiol-Molekül erfolgt.

Im zweiten Kapitel wird die Anwesenheit einer 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Uterus nachgewiesen, die Östradiol zu Östron oxydiert.

Im letzten Abschnitt wird festgestellt, daß parallel mit der Oxidation von Östradiol-17a-T das freiwerdende Tritium auf ein reduzierbares 17-Keto-Steroid übergeht. Dieser Tritium-Transfer erfolgt am gleichen Enzymprotein wie die Östradiol-Oxidation.

Dieser Tritium-Transfer wird hauptsächlich in der Leber als Stoffwechselorgan beschrieben.

Da aber auch im Uterus eine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase vorhanden ist, soll im nächsten Versuch festgestellt werden, ob auch im Uterus ein Tritium-Transfer erfolgt. Außerdem soll eine Identifizierung des gebildeten Metaboliten erfolgen.

1. Tritium-Transfer im Uterus infantiler Ratten:

Uteri infantiler Ratten werden mit Östradiol-17a-T und 5a-Androst-3en-17on als Acceptor inkubiert und der entstandene Metabolit, wie in Methodik beschrieben, bestimmt.

Es erfolgt ein geringer, aber meßbarer Tritium Transfer. Bezogen auf die eingesetzte Östradiol-Aktivität, findet man 1 % der Aktivität im Metaboliten wieder.

2. Tritium-Transfer im Uterus erwachsener Ratten:

Uterus Gewebe von Ratten mit dem Cyclus-Stadium des Diöstrus wird mit Donator- und Acceptor-Steroid inkubiert und anschließend der Metabolit bestimmt.

Die Ausbeute an reduziertem Acceptor liegt bei 0,1 %.

Erwachsene Ratten werden im Diöstrus vorbehandelt mit Diäthylstilböstrol, um die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu induzieren. Nach 16 Stunden erfolgt die Uterus-Präparation und die Inkubation mit Donator- und Acceptor-Steroid.

Ca. 0,1 % der eingesetzten Aktivität wird im Reduktionsprodukt wiedergefunden.

Die höhere Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase auf Grund der Enzym-Induktion hat keinen Einfluß auf den Tritium-Transfer zwischen Steroiden.

Im infantilen Uterus verläuft der Tritium-Transfer zu einem höheren Prozentsatz als im erwachsenen Uterus.

3. Identifizierung des gebildeten 5 α -Androst-3 α -17ol:

Bei der DC-Trennung der Metabolite vom Ausgangs-Substrat wird Radioaktivität gemessen in Höhe des RF' Wertes der Referenz-Substanz 5 α -Androst-3 α -17ol. Um eine eindeutige Aussage über die che-

mische Qualität des entstandenen Metaboliten zu ermöglichen, soll eine chemische und chromatografische Identifizierung vorgenommen werden.

Ein Inkubationsansatz mit Uterus-Gewebe, Donator- und Acceptor-Steroid wird 90 Min. inkubiert. Am Ende der Reaktion soll eine große Konzentration an Tritium-reduziertem Acceptor vorliegen. Der entstandene Metabolit wird über DC im Fließmittel Chloroform/Aceton vom Östradiol getrennt. Als Referenz Substanz dient 5a-Androst-3en-17ol-4-¹⁴C. Wie in Methodik beschrieben, wird mit dem Metaboliten und parallel dazu mit der Referenz-Substanz eine Mikro-Acetylierung vorgenommen.

Nach Aufarbeitung der Reaktionsansätze wird eine DC-Trennung der Steroide im Fließmittel Chloroform/Aceton vorgenommen. Dabei zeigt das Acetylierungsprodukt des Metaboliten das gleiche chromatografische Verhalten wie die acetylierte Referenz-Substanz.

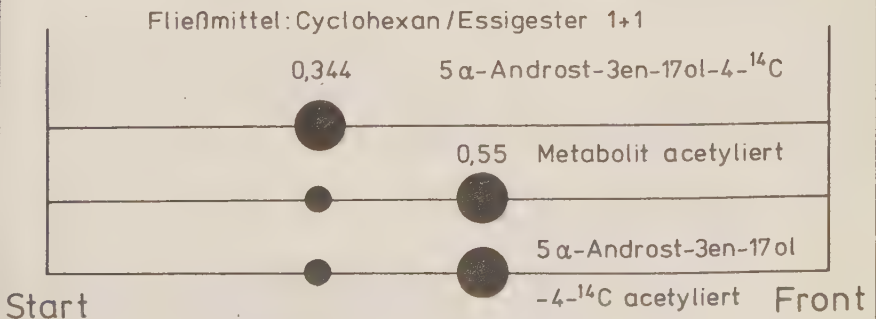
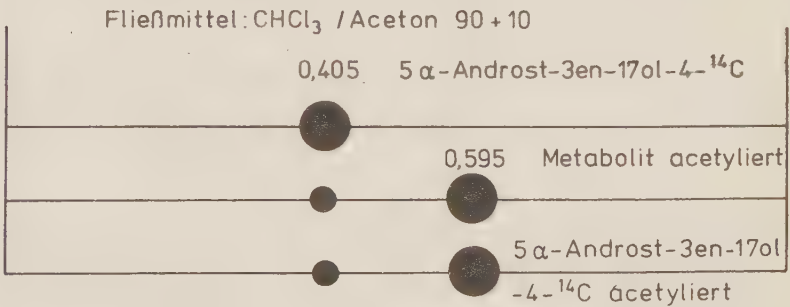
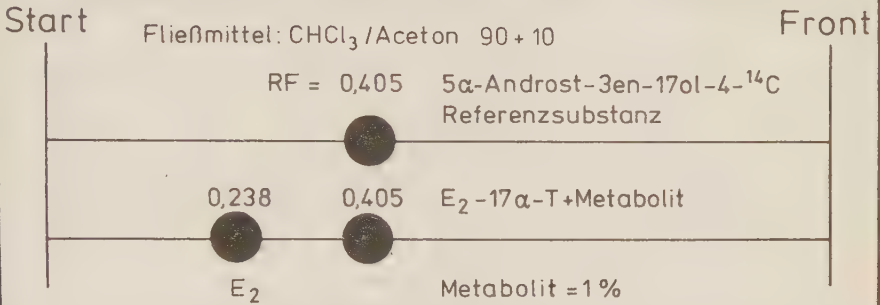
Nach Abschaben und Eluieren der Peaks wird im Fließmittel Cyclohexan/Essigester rechromatografiert.

Auch in diesem Fließmittel stimmen die RF-Werte der beiden acetylierten Substanzen überein.

Dies gilt als Beweis, daß der gemessene Metabolit das erwartete 5a-Androst-3en-17ol ist.

Abbild.15: T-Transfer im Uterus Identifizierung des Metaboliten

100 mg Uterus Schnitte werden 90 Min. bei 37° C mit 10⁻⁶ M/l E₂-17a-T und 10⁻⁵ M/l Acceptor inkubiert. Nach Extraktion der Steroide erfolgt DC-Trennung. Nach Acetylierung des Metaboliten erneute DC-Trennung, anschließend Rechromatografie, schematische Darstellung.



3.6. Besteht eine Konkurrenz um das Tritium vom Östradiol-17a-T zwischen Acceptor-Steroid, Gewebe und Sauerstoff?

Bei der enzymatischen Oxidation von Östradiol im Organismus entsteht zunächst reduziertes Co-Enzym NAD(P)H. Für das reduzierte Co-Enzym bestehen folgende Möglichkeiten, seinen Wasserstoff weiterzugeben:

1. Der Wasserstoff wird für reduktive Synthesen im Organismus verwendet, er wird ins Gewebe eingebaut.
2. Der Wasserstoff wird in die Atmungskette eingeschleust und es entsteht H_2O .
3. Der Wasserstoff des Co-Enzyms reduziert ein anderes Molekül, ein reduzierbares Keto-Steroid, einen Wasserstoff-Acceptor.

Voraussetzung für diese Reaktionen ist die Anwesenheit einer 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, die Östradiol unter Bildung von NAD(P)H oxydiert.

Eine hohe Enzymaktivität der Dehydrogenase liegt vor in der Leber. Außerdem wird das Enzym, wenn auch nur in sehr geringer Aktivität, nachgewiesen im Uterus.

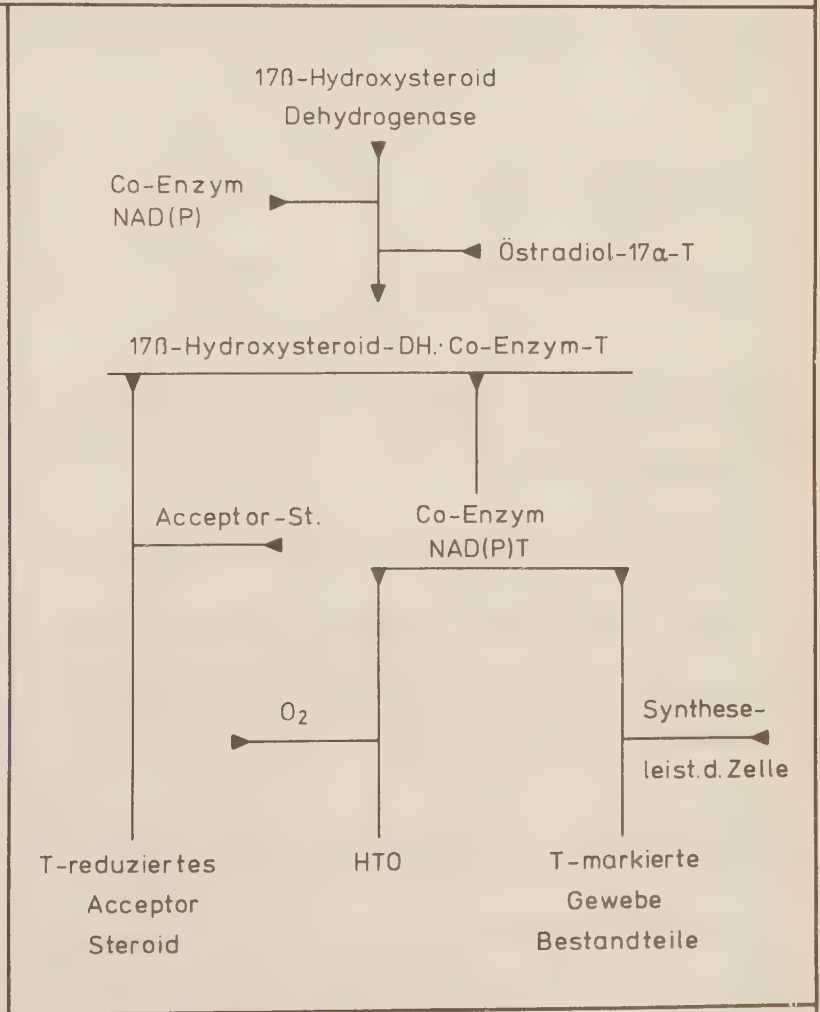
Im Folgenden soll in der Leber und im Uterus untersucht werden, ob eine Konkurrenz besteht um das Tritium vom Östradiol-17a-T zwischen Gewebe, Sauerstoff und Acceptor-Steroid.

1. Versuche mit Lebergewebe:

Leberhomogenat wird inkubiert mit Östradiol-17a-T und 5a-Androst-3en-17on als Acceptor-Steroid. Es werden Parallelversuche unter

Abbild. 16: Konkurrenzreaktionen um das Tritium von Östradiol-17 α -T

Schematische Darstellung der Reaktionswege für das Tritium vom Östradiol-17 α -T nach der enzymatischen Östradiol Oxidation.



aeroben und anaeroben Bedingungen durchgeführt. Wie in Methodik beschrieben, wird die Aktivität im Gewebe, in Form von HTO und als Tritium reduzierter Acceptor bestimmt.

Die Versuche führen zu folgendem Ergebnis: Vergl. Abbildung 17.

Unter anaeroben Bedingungen entsteht weniger HTO als unter aeroben Bedingungen.

Unter anaeroben Bedingungen wird mehr Aktivität ins Gewebe eingebaut als unter aeroben Bedingungen.

Unter anaeroben Bedingungen geht mehr Tritium auf das Acceptor-Steroid über als unter aeroben Bedingungen.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß in der Leber eine Konkurrenz besteht um das Tritium aus Östradiol-17a-T zwischen Gewebe, Sauerstoff und Acceptor-Steroid.

2. Versuche mit Uterus Gewebe: Vergl. Abbildung 17.

Uterus-Gewebe infantiler Ratten wird mit Tritium-Donator- und Acceptor-Steroid unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Außerdem erfolgt eine Inkubation mit Uterus-Gewebe Östrogen vorbehandelter erwachsener Tiere.

Wie in Methodik beschrieben, erfolgt die Bestimmung der Aktivitätsverteilung im Gewebe, als HTO und als Tritium reduzierter Acceptor.

Bei der anaeroben Inkubation infantiler Rattenuteri mit Östradiol-17a-T wird in Gegenwart des Acceptor-Steroids weniger Aktivität ins Gewebe

eingebaut als ohne Acceptor. Bei der anaeroben Inkubation wird in Gegenwart des Acceptor-Steroids weniger HTO gebildet als in den Ansätzen ohne Acceptor.

Eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit Östrogenen hat keinen Einfluß auf den Tritium-Transfer zwischen Steroiden und das Verteilungsmuster der Aktivität zwischen Gewebe, Sauerstoff und Acceptor-Steroid.

Abbild.17:Weg des T von E₂-17α-T bei Inkubation

In vitro Versuche zum Weg des Tritiums bei Inkubationen mit Östradiol-17a-T

Gewebe	Bedingungen	Verteilung der Aktivität	Ausbeute in Metaboliten in %	
			aerob	anaerob
200 mg Leberhomogenat, Rattenweibchen	mit Acceptor	Gewebe HTO reduz. Accept. E ₂	23	32
	50·10 ⁻⁶ M/l		17	7
	0,5·10 ⁻⁶ M/l E ₂ -17a-T		19,5	20,8
	15 Min. 37° C		30,5	40,2
10 mg infant. Uterus 1·10 ⁻⁹ M/l E ₂ -17a-T 30 Min. 37° C	mit Acceptor	Gewebe HTO reduz. Accept. E ₂	2,4	4
	0,5·10 ⁻⁶ M/l		3,8	< 0,1
	1·10 ⁻⁹ M/l E ₂ -17a-T		1,0	2,8
	30 Min. 37° C		92,8	93,1
+) 100 mg. erw. Uterus, östrogenvorbehandelt	ohne Acceptor	Gewebe HTO E ₂	3,8	9
	3·10 ⁻⁹ M/l E ₂ -17a-T		+) 10,4	0,6
	60 Min. 37° C		85,8	90,4

3.7. Zusammenfassung und Folgerung aus den Ergebnissen

Das Ziel der Versuche in diesem Abschnitt ist die Klärung der Frage, ob und auf welche Weise die Östradiol-Oxidation durch ein reduzierbares Keto-Steroid beeinflusst werden kann.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann man Folgendes interpretieren:

1) Zur Parallelität zwischen Östradiol-Oxidation und Tritium-Transfer:

Es besteht eine Parallelität zwischen Östradiol-Oxidation und dem Tritium-Transfer zwischen Steroiden: Die Enzymaktivität für beide Reaktionen ist in der Mikrosomenfraktion des Lebergewebes lokalisiert, für beide Reaktionen wird NAD oder NADP als Co-Enzym benötigt (Abbild. 13). Die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase katalysiert nicht nur die Östradiol-Oxidation, sie ist auch für den Tritium-Transfer verantwortlich. Eine Beeinflussung der Östradiol-Oxidation muß über dieses Enzymsystem erfolgen.

Nicht damit in Einklang zu bringen sind folgende Befunde:

Auch im Uterus wird neben einer Östradiol-Oxidation ein Tritium-Transfer nachgewiesen (Abbild. 15). Diese Reaktion wird auch von Wenzel und Hieronimus beschrieben (Diss. Hieronimus 71 FU Berlin). Die Östradiol-Dehydrogenase läßt sich im Uterus induzieren, zu erkennen an einer erhöhten Östradiol-Oxidation. Diese Dehydrogenase-Induktion hat jedoch keinen Einfluß auf den Tritium-Transfer (Abbild. 17). Andererseits liegt im infantilen Uterus eine höhere Dehydrogenase-Aktivität vor als im erwachsenen Uterus, parallel dazu verläuft der Tritium-Transfer im infantilen Uterus zu einem höheren Prozentsatz als im erwachsenen Uterus. Das besagt, daß der Tritium-Transfer doch abhängig ist von der Enzym-

Konzentration. Eine Erklärung dieser Widersprüche kann nicht gegeben werden.

2) Vergleich des T-Transfers von Steroiden und Nicht-Steroiden

Es besteht in der Leber eine hohe Spezifität des Tritium-Transfers zwischen Steroiden. Der Tritium-Transfer von Nicht-Steroid T-Donatoren auf Steroide verläuft in einem um Zehnerpotenzen geringeren Ausmaß. Aus diesen Befunden wird der Mechanismus des Tritium-Transfers abgeleitet, wodurch geklärt wird, warum ein 17 Keto-Steroid so einen großen Einfluß auf die Östradiol-Oxidation hat.

Die Versuche mit Nicht-Steroiden als Tritium-Donatoren ergeben nur einen Tritium-Transfer von 0,02 %. Dieser Wert liegt sehr niedrig und ist mit einem großen Fehler behaftet. Dies ist aber ein Zeichen dafür, daß der Tritium-Transfer nach dem genannten Schema verläuft. Zwischen diesen Werten und den Ausbeuten an T-reduziertem Acceptor bei Steroid-T-Donatoren liegen jedoch mehrere Zehnerpotenzen. Dies gilt als ein weiterer Hinweis auf die Richtigkeit des postulierten Mechanismus des T-Transfers.

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Interesse, daß durch die Glucose-6-P-Dehydrogenase bei der Glucose-Oxidation gebildetes reduziertes Co-Enzym die Doppelbindung im Ring A des angebotenen Steroids hydriert. Diese von Leybold und Staudinger (55) beschriebene Reaktion wird von Wenzel und Hoffrichter (unveröff.) zur Darstellung von Dihydrotestosteron herangezogen. Um so erstaunlicher ist es, daß keine Reduktion der 17-Keto-Gruppe mit T-reduziertem Co-Enzym zu beobachten ist, sondern lediglich durch Wasserstoff-reduziertes Co-Enzym inaktives reduziertes Steroid gebildet wird.

3) Konkurrenz verschiedener Wege für das T aus E_2 - 17a-T in der
Zelle

Bei den Versuchen der Konkurrenzreaktionen um das Tritium vom Östradiol-17aT ergibt sich, das der Tritium-Transfer zwischen Steroiden durch verschiedene Faktoren zu beeinflussen ist. Wird ein möglicher Weg des Tritiums vom Östradiol-17a-T durch geeignete Versuchsbedingungen blockiert, wird vermehrt Tritium in die verbleibenden Reaktionswege eingeschleust (Abbild. 17).

Diese Konkurrenzreaktionen werden prinzipiell gleich in der Leber und im Uterus beobachtet.

Der Bedarf an Wasserstoff für reduktive Prozesse ist im physiologischen Ablauf des Zellstoffwechsels möglicherweise limitiert. Reduzierbare Substrate aber, speziell mit Steroid-Struktur und einer 17-Keto Gruppe, stellen einen ausgezeichneten Acceptor dar für das Tritium bzw. den Wasserstoff vom Östradiol. In diesem Fall erfolgt eine beschleunigte Östradiol-Oxidation, da reduziertes Co-Enzym den Wasserstoff sofort auf das Acceptor-Steroid überträgt und somit immer ausreichend oxydiertes Co-Enzym zum Transport des Wasserstoffs bzw. Tritiums vom Östradiol zur Verfügung steht.

Nach Betz und Warren (51) wird das Steroid nur an den 20-OH-Steroid-Dehydrogenase-Co-Enzym Komplex und nicht an die freie Dehydrogenase gebunden. Außerdem diffundiert nach Betz und Taylor (52) das Steroid eher aus diesem Komplex ab als das Co-Enzym. Dies zeigt eine Parallelität zum postulierten Reaktionsmechanismus.

Durch Nicht-Steroide erzeugtes NADH oder NADPH muß erst von den entsprechenden Dehydrogenasen dissoziieren und sich an die

Hydroxysteroid-Dehydrogenase anlagern, bevor ein Acceptor-Steroid reduziert werden kann. Ist aber in der Zelle durch ein Hydroxy-Steroid an der Steroid-Dehydrogenase NADH oder NADPH erzeugt worden, so überwiegt dessen Reduktionswirkung gegenüber NADH oder NADPH, das an anderen Dehydrogenasen gebildet wird.

Als Antwort auf die in diesem Abschnitt gestellte Frage kann gesagt werden, daß die Östradiol-Oxidation durch ein reduzierbares Keto-Steroid beeinflußt werden kann. Man kann das Red/Ox Verhältnis von Steroiden im Organismus beeinflussen, ohne daß dadurch das Red/Ox Verhältnis anderer Systeme verändert wird.

C. DISKUSSION DER ERGEBNISSE AUS DEN EINZELNEN ABSCHNITTEN IN VERBINDUNG MIT DER LITERATUR

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Zusammenhänge erarbeitet werden zwischen Red-Ox Reaktionen und der biochemischen Wirkung von Östradiol.

Zunächst erscheint eine Zweiteilung der gestellten Aufgabe sinnvoll:

Einerseits laufen Red-Ox Reaktionen im weitesten Sinne in der Leber als Stoffwechselorgan ab, also auch bei Östron/Östradiol. Dort ist auch eine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase lokalisiert (10, 13, 44). Andererseits ist die endokrinologische Wirkung von Östradiol fixiert auf ein Erfolgsorgan, z. B. den Uterus (1, 2, 8). In diesem Östrogen-Erfolgsorgan existieren spezielle Rezeptoren, über die das Hormon Östradiol seine vielfältigen biochemischen Reaktionen entfaltet (9).

Es scheint im Organismus eine strenge Aufteilung zu bestehen zwischen Organen mit reiner Stoffwechselfunktion in Bezug auf Östradiol und solchen mit "Hormonfunktion", in denen keine Östradiol-Oxidation als Stoffwechselreaktion erfolgt.

Jensen geht bei seinen Untersuchungen auch von dieser Vorstellung aus (1, 2, 8, 12).

Die eigenen Versuche zur Bindung von Östradiol im Uterus zeigen jedoch, daß auch im Uterus eine enzymatische Östradiol-Oxidation erfolgt (Abbild. 2, 4). Nur so lassen sich die verschiedenen Einbauraten bei E₂-17 α -T und E₂-6,7-T im Uterus erklären.

Vom theoretischen Standpunkt wäre die Östradiol-Oxidation sinnvoll, wenn nach Erfüllung seiner Funktion das Östradiol vom Kern-Rezeptor abdissoziiert. Der Uterus als Östrogen Erfolgsorgan durchläuft wäh-

rend eines Cyclus Phasen mit hoher Rezeptor- und Östradiol-Konzentration und Phasen mit geringer Östradiol Konzentration.

Wenn die Hormonwirkung des Östradiols nicht durch Oxidation zu Östron zeitlich begrenzt würde, käme es im Uterus zu einer unphysiologischen Akkumulation von Östrogenen. Es gibt Hinweise darauf, daß schon eine Oxidation im Kern erfolgt, wodurch eine Inaktivierung des Moleküls erreicht wird und es zur Abdissotiation veranlaßt wird (53).

Verantwortlich für diese Red-Ox Reaktion im Uterus ist eine 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Das Enzym wird im infantilen Uterus nachgewiesen und im erwachsenen Uterus durch Vorbehandlung mit Östrogenen induziert (Abbild. 8, 9, 10).

Die Dehydrogenase oxydiert Östradiol zu Östron, die Reaktion verläuft nicht reversibel (Abbild. 10) (37).

Die Versuche zur Beeinflussung der Östradiol-Oxidation durch ein zweites Steroid zeigen, daß in der Leber die Östradiol-Oxidation durch ein reduzierbares Keto-Steroid beeinflusst werden kann (Abbild. 13, 14).

Dieser Tritium-Transfer wird auch im Uterus nachgewiesen (Abbild 15). Grundlagen für diese Versuche sind Arbeiten von Talalay (13), Karavolas (42) und Wenzel (43, 44, 45).

Die Versuche der Konkurrenz verschiedener Wege für das Tritium aus Östradiol 17a-T lassen vermuten, daß die Oxidation und der Tritium-Transfer in der Leber und im Uterus prinzipiell nach dem gleichen Mechanismus ablaufen (Abbild. 17). Ein Vergleich der Werte der Östradiol-Oxidation für die Leber und den Uterus zeigt die großen Unterschiede zwischen diesen Organen. Denn obwohl qualitativ in den Reaktionen eine Übereinstimmung besteht, verlaufen sie quantitativ in ganz unterschiedlichen Größenordnungen.

Es wäre falsch, auf Grund der nachgewiesenen Oxidation dem Uterus eine Stoffwechselfunktion zuzuordnen. Durch die Induktion der Steroid-Dehydrogenase erfolgt zwar in einem gewissen Rahmen eine Kontrolle des Östradiolspiegels im Erfolgsorgan, das eigentliche Stoffwechselorgan ist jedoch die Leber.

Zusammenhänge zwischen Red-Ox Reaktionen und der biochemischen Wirkung von Östradiol könnten auf folgende Weise bestehen:

Im Organismus gebildetes oder zugeführtes Östradiol gelangt in den Uterus als Erfolgsorgan, wo es über die Rezeptoren seine biochemische Wirkung entfaltet. Diese Wirkung ist fixiert auf das intakte Molekül. Nicht gebundenes Östradiol gelangt in die Leber und wird zum hormonell inaktiven Östron oxydiert.

Die Östradiol-Produktion, die Östradiol-Wirkung und die Östradiol-Oxidation erfolgt jeweils in verschiedenen Organen.

In einem hochorganisiertem Organismus erscheint eine derartige Differenzierung der Funktionen sinnvoll. Eine noch weitere Differenzierung bzw. Kompartimentierung in der Zelle selbst zeigen die einzelnen enzymatischen Reaktionen in der Leberzelle (47)(Abbild. 13). Im Uterus wird ebenfalls unterschieden zwischen unspezifischen cytoplasmatischen und spezifischen Kern-Rezeptoren für Östradiol. Die im Uterus gefundene geringe Dehydrogenase-Aktivität (Abbild. 8, 9, 10) ist möglicherweise im Zellkern lokalisiert (53).

Demnach könnte diese Dehydrogenase nur das an den Kern-Rezeptor gelangte Östradiol oxydieren. An cytoplasmatische Rezeptoren gebundenes Östradiol würde abdissoziieren und in der Leber oxydiert.

Es bleibt zu klären, ob diese Annahme zutrifft.

Durch Auftrennung des Uterusgewebes in einzelne Fraktionen wie Kerne und Cytoplasma und Bestimmung der Dehydrogenase-Aktivität in diesen Fraktionen kann das Problem vielleicht gelöst werden.

D. MATERIAL UND METHODIK

1. Material

Versuchstiere:

Als Versuchstiere dienen Wistar Ratten aus der Labortierzucht Firma Hagemann, Bösingfeld/Hannover, und zwar erwachsene Rattenweibchen mit einem Durchschnittsgewicht von 200 g und 18 - 21 Tage alte infantile Rattenweibchen.

Substanzen:

Radioaktive Substanzen der Firma Amersham/Buchler:

Östradiol-17a-T	11 Ci / m Mol
Östradiol-6, 7-T	40 Ci / m Mol
Östradiol-4- ¹⁴ C	58mCi/ m Mol
Lactat-2-T	2, 3Ci/ m Mol
Glucose-1-T	5, 3 Ci/ m Mol
5a-Androst-3en-17on-4- ¹⁴ C	56mCi/m Mol (Synth. Mützel. Diss. FU. 70)
5a-Androst-3en-17ol-7a-T	3 Ci /m Mol (Synth. Goed. Diss. FU. 73)

Vor der Verwendung der radioaktiven Substanzen erfolgt eine chromatografische Reinheitskontrolle.

Die Reinigung von Östradiol-17a-T 11 Ci / m Mol geschieht folgendermaßen:

Die originäre Östradiol-Lösung wird bandförmig über die ganze Breite auf eine DC Platte aufgetragen. Die DC Platte wird vorher mit konz. HCl gewaschen, um Metall-Spuren zu entfernen. Es wird einmal chro-

matografiert in Chloroform-Aceton 90 : 10 mit 100 mg Phenol Zusatz. Nach dem Ausmessen der Platte mit dem Dünnschicht-Scanner wird das Kieselgel mit dem RF-Wert von Östradiol abgeschabt und in eine kleine, unten mit Watte verschlossene Säule überführt. Es wird mit Äthanol bis zu einem definierten Volumen eluiert. Aus einem Aliquot dieser Lösung wird die Aktivität bestimmt. Es erfolgt eine chromatografische Reinheitskontrolle und eine HTO Bestimmung. Es resultiert ein Reinheitsgrad von 99,9 % und ein HTO Gehalt von weniger als 0,1 %.

Inaktive Steroide stammen von der Firma Merck oder Schering.

Diese und alle anderen Substanzen und Reagentien weisen p. a. Qualität auf oder werden chromatografisch gereinigt. Die verwendeten Lösungsmittel werden vor Gebrauch destilliert und unter Lichtschutz aufbewahrt.

Enzyme und Co-Enzyme sind Produkte der Firma Boehringer Mannheim.

Geräte:

Zum Homogenisieren von Lebergewebe wird ein Potter Elvehjem Homogenisator bei 200 U/Min. benutzt, zum Homogenisieren von Uterus Gewebe ein Atomixmill mit 1000 U/Min.

Für Inkubationen wird ein Warburg Schüttelthermostat benutzt.

Die Herstellung von morphologischen Zellfraktionen erfolgt mit einer Beckman Spinco Ultrazentrifuge mit Festwinkel-Rotor Typ Titan 50.

Gewebe-Proben werden in einem Gefriertrockner der Firma Christ getrocknet.

Ein Verbrennungsautomat Mikromat BF 5010 der Firma Berthold dient zur Verbrennung von ^3H und ^{14}C haltigen kleinen Gewebeprobemengen.

Radiaktive Proben in Lösung oder Suspension werden gemessen in Toluol- oder Dioxan-Szintillationslösung mit einem Beckman LS 150 Flüssig-Szintillationsmeßgerät.

Für die Chromatografie werden Dünnschicht Platten mit Kieselgel F 254 und 0,25 mm Schichtdicke von Merck benutzt.

Die Lage der radioaktiven Maxima auf den Platten wird ermittelt mit einem Dünnschicht-Scanner der Firma Berthold.

2. Methodik

Gewebe:

Nach Betäuben der Versuchstiere mit Chloroform werden die Tiere getötet und nach dem Ausbluten die benötigten Organe entnommen.

Organschnitte:

Die Organe werden von Fett und anhaftendem Gewebe befreit. Auf einem Eisblock werden von weichen Geweben mit einer Rasierklinge 0,5 mm dünne Schnitte angefertigt.

Uteri werden der Länge nach aufgeschnitten und zwischen Filterpapier getrocknet. Infantile Uteri werden insgesamt verwendet, erwachsene Uteri werden in 10 bis 20 mg große Stücke zerschnitten.

Homogenate:

Eine entsprechende kleingeschnittene Gewebemenge wird in eisgekühlte Krebs-Ringer-TRIS Pufferlösung überführt und mit der 10 fachen Menge an Puffer homogenisiert: Lebergewebe mit dem Potter Elvehjem Homogenisator, muskulöses Gewebe wie Uterus im Atomixmill, 4 mal 15 Sekunden.

Gewebe-Fractionen

Chemische Fractionen (54)

Lipoide:

Die Gewebeprobe, ca. 20 mg, wird 5 Min. bei 70 Grad mit 0,5 ml Äthanol extrahiert, anschließend mit Äthanol/Äther 3 : 1 bei 55 Grad und zusätzlich mit Äther gewaschen.

Die erhaltene Fraction stellt die Lipoid-Fraction dar. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird mit Szintillatorlösung versetzt und die Radioaktivität im Flüssig-Szintillationszähler gemessen.

Nucleinsäuren:

Der Geweberückstand der Lipoid-Fraction wird 10 Min. mit 1 ml 3 % eisgekühlter Perchlorsäure extrahiert, anschließend noch einmal mit 0,5 ml.

Die gesammelten Perchlorsäure-Extrakte werden mit KOH neutralisiert, mit Szintillatorlösung versetzt und die Aktivität bestimmt.

Der Geweberückstand wird 20 Min. bei 70 Grad mit 1 ml 10 % Perchlorsäure extrahiert. Anschließend erfolgt Neutralisation des Extrakts und Messung der Radioaktivität in dieser Fraktion.

Proteine:

Der Geweberückstand der Perchlorsäure-Extraktion wird mit 3 ml Äthanol, 3 ml Äthanol/Äther 3 : 1 und Äther gewaschen. Nach Verdunsten des Äthers in der Wärme wird zu der Gewebe-Probe 1 ml Soluene TH 100 (Firma Packard) zur Auflösung des organischen Materials gegeben und ca. 3 Stunden auf 40 Grad erwärmt. Danach werden 50 bis 80 μ l Essigsäure und 15 ml Toluol-PPO zugefügt.

Es wird bis zur konstanten Impulsrate gemessen.

Morphologische Zellfraktionen (35)

Zellkerne:

Das Gewebe Homogenat wird 10 Min. bei 800 x g entspr. 3000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Das Sediment, bestehend aus Zellkernen und Zellwandmaterial, wird 2 mal mit 5 ml Puffer gewaschen.

Diese Fraktion wird als Kern-Fraktion bezeichnet.

Mitochondrien:

Der Überstand der ersten Zentrifugation wird 15 Min. bei 1500xg entspr. 12000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Das Sediment wird 2 mal mit 5 ml Puffer gewaschen und stellt die Mitochondrienfraktion dar.

Mikrosomen:

Der Überstand der zweiten Zentrifugation wird 60 Min. bei 105000xg entspr. 41000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Das Sediment wird 2 mal mit 5 ml Puffer gewaschen und als Mikrosomenfraktion bezeichnet.

Zur Inkubation mit Mikrosomen wird die Fraktion in einer entsprechenden Menge Puffer suspendiert und homogenisiert.

Cytoplasma:

Der nach Abtrennung der Mikrosomen verbleibende Überstand stellt die Cytoplasmafraktion des Gewebes dar.

Versuchsanordnungen

In vivo Versuche

Cyclus Kontrollen nach Allen/Doisy: (56, 57)

Zur Bestimmung des Cyclus-Stadiums der Versuchstiere werden täglich über einen Zeitraum von 8 Tagen Vaginalabstriche entnommen. Nach dem Trocknen, Fixieren und Anfärben der Präparate mit Giemsa Lösung 1 : 20 erfolgt mikroskopisch die Bestimmung der Cyclus-Phase.

Diöstrus:

Ruhephase, wenige kernhaltige Epithelzellen einige Leukozyten und Schleim.

Proöstrus:

Kein Schleim, wenig Leukozyten, viele kernhaltige Epithelzellen.

Östrus:

Früher Östrus, kernlose keratinisierte Vaginalschollen, einzelne kernhaltige Oberflächenzellen.

Später Östrus, verklumpte Vaginalschollen, einzelne Leukozyten.

Metöstrus:

Zahlreiche Leukozyten, Auftreten von basalen Epithelzellen.

Vorbehandlung:

Zur Enzyminduktion der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wird den Versuchstieren im Diöstrus-Stadium einmal 1 mg pro kg Körpergewicht einer östrogenen Substanz intraperitoneal injiziert. Die Substanz, Östradiol oder Diäthylstilböstrol, wird in Äthanol gelöst und mit 0,9 % NaCl zu einem Mischungsverhältnis 1 : 1 versetzt.

Zur Bestimmung des Tritium-Einbaues aus Östradiol erhalten die Tiere eine i. p. Injektion von 0,2 μ g radioaktivem Östradiol in 0,2 ml Äthanol/0,9 % NaCl.

In vitro Versuche

Inkubationsansätze

Ein Inkubationsansatz besteht aus Pufferlösung und darin gelösten oder

suspendierten Substanzen. Für Gewebeschnitte und Gesamtorgane wird Krebs-Ri- PO_4 - Puffer pH 7,4 mit 1 mg pro ml Glucose verwendet, für Gewebehomogenate und Gewebefractionen Krebs-Ringer-Tris-Puffer pH 7,4. Zu einem Inkubationsansatz gehört das Gewebe oder die Zellfraktion als Enzymquelle, ferner die entsprechenden Co-Enzyme und Substrate. Steroide werden in Äthanol gelöst, bei anaeroben Inkubationen in Propylenglykol, jeweils in 0,1 ml. Das Ansatzendvolumen beträgt immer 3,2 ml. Bei allen Versuchen wird mindestens ein Blindwert mitgeführt, ein Ansatz, der außer der Radioaktivität alle Komponenten eines Ansatzes enthält und in gleicher Weise aufgearbeitet und gemessen wird.

Inkubationsstart erfolgt durch Einbringen des kompletten Ansatzes in den auf 37 Grad temperierten Warburg Schüttelthermostaten. Bei anaeroben Inkubationen erfolgt der Start durch Zugabe des Substrates aus dem Seitenarm des Inkubationsgefäßes.

Die Inkubationszeit beträgt bei enzymatischen Reaktionen in der Regel 15 Min., bei in vitro Einbau-Versuchen 90 bis 120 Min.

Eine Vorinkubation ist bei anaeroben Inkubationen erforderlich, um vor dem Reaktionsstart durch Stickstoff Begasung eine sauerstoff-freie Atmosphäre zu schaffen, sie erfolgt 15 Min. bei 37 Grad (z.B. bei Abbild. 17).

Bei aeroben Inkubationen wird vorinkubiert, wenn vor der Hauptreaktion eine Substanz auf das Gewebe oder das Enzymsystem einwirken soll oder wenn durch die Vorinkubation das Substrat erst erzeugt wird (z.B. bei Abbild. 6).

Eine Nachinkubation ist erforderlich, um bei Einbau Versuchen nicht im Gewebe gebundene radioaktive Substanz durch einen Verdünnungseffekt mit inaktivem Material auszuwaschen. Dazu wird das Gewebe aus der Hauptinkubation in einen neuen Ansatz überführt, der einen 100 fachen Überschuß an inaktiver Substanz enthält. Es wird 30 Min. bei 25 Grad inkubiert (z. B. bei Abbild. 2, 4).

Inkubationsstop erfolgt durch Einbringen der Inkubationsgefäße in Eis und Zugabe von Chloroform.

Aufarbeitung

Zur Bestimmung der Metabolite werden die Inkubationsansätze 3 mal mit 3 ml Chloroform ausgeschüttelt. Zur Vermeidung von Zersetzen des radioaktiven Steroids wird den Chloroform Extrakten ein Überschuß an inaktivem Steroid zugefügt. Die Chloroform Phase wird im warmen Wasserbad im Luftstrom abgedunstet. Der Rückstand wird mehrmals in Aceton aufgenommen und quantitativ mit einer Kapillare in Bahnen von 2,5 cm Breite auf eine DC Platte aufgetragen. Nach Kammer-sättigung wird chromatografiert im Fließmittel Chloroform/Aceton 90/10 mit 100 mg Phenolzusatz als Antioxidans.

Inaktive Steroide dienen bei der DC als Referenz Substanzen.

Die Lage der radioaktiven Maxima auf den Platten wird ermittelt mit dem Dünnschicht-Scanner.

Durch Ansprühen der Platten mit Äthanol/Schwefelsäure 1/1 wird die Lage der Substanzen sichtbar gemacht.

Die quantitative Auswertung der Scanner-Diagramme geschieht durch Planimetrie oder mit Hilfe von Integrationskurven. Die Zählausbeute

des Scanners liegt für Tritium bei 1 %, für ^{14}C bei 20 %.

Die Wiederfindung an Aktivität beträgt im Durchschnitt 90 %.

HTO: Aus den Inkubationsüberständen wird nach der Chloroform Extraktion bei Einsatz Tritium-markierter Substrate eine HTO Bestimmung durchgeführt. Ein Aliquot des Überstandes wird nach dem Alkalisieren einer Gefrierdestillation unterworfen. Das Gerät besteht aus zwei kommunizierenden Röhren, die evakuiert werden können. In dem einen Röhrchen wird die Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Evakuierung des Systems wird das leere Röhrchen in flüssigen Stickstoff eingehängt. In dieser Vorlage kondensiert das HTO. In einem Aliquot dieses Destillats wird im Flüssigszintillationszähler die Radioaktivität bestimmt.

Zur Bestimmung der Radioaktivität im Gewebe wird die Gewebeprobe oder ein Teil davon zunächst 12 Stunden bei -30 bis -10 Grad der Gefrierdestillation unterworfen.

Anschließend wird die Probe in einem Gerät zur Verbrennung ^3H und ^{14}C haltiger Proben verbrannt. (58)

Das Gewebe wird auf einem Probenhalter in ein Glasgefäß eingebracht. Nach Begasen des Verbrennungsgefäßes mit Sauerstoff wird die Probe von außen durch eine Halogenlampe gezündet. Das Material verbrennt zu $^{14}\text{CO}_2$ und HTO. Das HTO kondensiert im vorgelegten Wasser.

Anschließend erfolgt die Bestimmung der Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler.

Zur Bestimmung der Aktivität in morphologischen Gewebefractionen wird nach Gefriertrocknung das biologische Material mit ca. 10 mg

Trockengewicht in 2 ml Soluene TM 100 der Firma Packard unter 2 stündigem Erwärmen auf 55 Grad aufgelöst.

Danach wird mit Essigsäure neutralisiert und nach Zugabe der entsprechenden Szintillatorlösung die Radioaktivität bis zur konstanten Impulsrate gemessen.

Flüssig Szintillationsmessung

Reine radioaktive Lösungen, wässrige Proben und von der DC Platte abgeschabte Kieselgelareale werden mit einer Dioxan Szintillationslösung im Beckman LS 150 Flüssig Szintillationszähler gemessen, Gewebeauflösungen in Soluene mit Toluol Szintillatorlösung.

Für Tritium und ^{14}C werden verschiedene Energiekanäle des Szintillations-Spektrometers benutzt.

Die Zählausbeute wird über einen externen Standard ermittelt, bei Kieselgel und Soluene Proben mit einem internen Standard.

Wegen des besseren Wirkungsgrades des Flüssig Szintillationszählers werden kleinste radioaktive Mengen, die auf der DC Platte nicht mit ausreichender Genauigkeit quantitativ bestimmt werden können, von der Platte abgeschabt und im Flüssig Szintillationszähler gemessen.

Acetylierung

Das Areal des vermuteten Metaboliten 5a-Androst-3en-17ol (T) wird von der Platte abgeschabt und in einer kleinen Säule mit Äthanol aus dem Kieselgel eluiert. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand in einigen Tropfen Benzol aufgenommen. Es werden 0,05 ml Acetanhydrid und 0,05 ml frisch destilliertes Pyridin zugefügt und die

Mischung 2 Stunden bei 60 Grad erwärmt.

In einem Parallelversuch wird die gleiche Reaktion mit 5a-Androst-3en-17ol-4-¹⁴C als Referenzsubstanz durchgeführt.

Anschließend erfolgt die DC Auftrennung im Fließmittel Chloroform/Aceton 90/10.

Nach Abschaben und Eluieren der radioaktiven Maxima wird im Fließmittel Cyclohexan/Essigester 1/1 chromatografiert.

Oxidation

In einer Mischung aus Östradiol-6,7-T und Östradiol-17a-T wird das prozentuale Verhältnis der beiden markierten Steroide ermittelt.

Ein Aliquot der Lösung wird nach Zugabe von 0,2 mg inaktivem Östradiol eingedampft und der Rückstand in 0,5 ml Aceton aufgenommen. Es werden 0,5 ml 3 % CrO₃ in Eisessig zugegeben und 8 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Danach wird mit Wasser auf 5 ml verdünnt und 3 mal mit 5 ml n-Hexan extrahiert.

Die organische Phase enthält Östron-6,7-T.

Die wässrige Phase enthält aus Östradiol-17a-T entstandenes HTO.

Nach Messung der Radioaktivität in den einzelnen Phasen wird das Verhältnis von Östradiol-6,7-T zu Östradiol-17a-T berechnet.

Die nach der in vivo Injektion aus den Uteri extrahierten Steroide werden chromatografisch aufgetrennt. Das Östradiol wird abgeschabt, eluiert und wie oben angegeben oxydiert.

Danach wird wie oben die Aktivität in den Phasen gemessen und erneut das Verhältnis von Östradiol-6,7-T zu Östradiol-17a-T ermittelt.

Zur Kontrolle, ob die Oxidation vollständig verläuft, wird ein Blindversuch mit Östradiol-17a-T Lösung durchgeführt.

E. LITERATUR

1. Jensen, E. V., Mokla, S., J. of Steroid Biochemistry
Gorell, T., Tanaka, S., 3 (1972) 445
DeSombre, E. R.

Jensen, E. V., Brecher, P. I., Biochem. Soc. Symposium
DeSombre, E., Numata, M.
2. Jensen, E. V. Proc. Canad. Cancer Res. Conf.
6 (1965) 143
3. Brecher, P. I., Vigersky, R. Steroids
Wotiz, H. H. 10 (1967) 635
4. Terenius, L., Acta Endocrinolog.
57 (1968) 669
5. Eisenfeld, A. J. Endocrinology
Axelrod, J. 79 (1966) 38
6. Feherty, P., Robertson, Biochemical J.
D. M., Waynforth, H. B., 120 (1970) 837
Kelhe, A. E.
7. Brecher, P. I., Endocrinology
Wotiz, H. H. 84 (1969) 718
8. Jensen, E. V. Annual Review of Bioch.
DeSombre, E. R. 41 (1972) 203
9. Hamilton, T. H. J. Biol. Chemistry
Widnell, C. C., Tata, J. R. 243 (1968) 408
10. Wenzel, M., Wolf, S. Hoppe Seylers Z. Phys. Ch.
Bollert, B. 352 (1971) 1248
11. Noteboom, W. D., Arch. Biochem. and Bioph.
Gorski, J. 111 (1965) 559
12. Jensen, E. V., Hurst, D. J. Science
DeSombre, E. R., Jungblut, 158 (1967) 385
P. W.
13. Talalay, P. Annual Review of Bioch.
34 (1965) 347

14. Lyttle, C. R. Steroids
Jellinck, P. H. 19 (1972) 89
15. Lyttle, C. R. Biochem. J.
Jellinck, P. H. 127 (1972) 481
16. Sweat, M. L. , Bryson, M. J. Endocrinology
Young, R. B. 81 (1967) 167
17. Pack, B. A. Endocrinology
Brooks, S. C. 87 (1970) 924
18. Breuer, H. Biochem. Biophys. acta
Dahm, K. 85 (1964) 29
19. Littmann, K. P. Acta Endocrinolog.
Gerdes, H. , Winter, G. 67 (1971) 473
20. Lehmann, W. D. Hoppe Seylers Z. Phys. Ch.
Breuer, H. 348 (1967) 1633
21. Karavolas, H. The J. of Biolog. Chem.
Baedecker, M. L. , 245 (1970) 4948
Engel, L. L.
22. Ball, P. Hoppe Seylers Z. Phys. Ch.
Breuer, H. 351 (1970) 1011
23. Jütting, G. European J. Biochem.
Thun, K. J. , Kuss, E. 2 (1967) 146
24. Jarabak, J. , Adams, J. A. The J. of Biolog. Chem.
Ashman, H. G. , Talalay, P. 237 (1972) 345
25. Karavolas, H. J. The J. of Biolog. Chem.
Engel, L. L. 241 (1966) 3454
26. Jütting, G. Acta endocrinolog.
155 (1970) 31
27. Hieronimus, B. Diss. FU Berlin, FB 22 (1971)
28. Wenzel, M. , Mützel, W. Biochem. J.
Hieronimus, B. 120 (1970) 899
29. Hori, T. , Ide, M. Endocrin. Japan.
Miyake, T. 15 (1968) 215

- | | | |
|-----|---|---|
| 30. | Lyttle, C.R.
Jellinck, P.H. | Steroids
19 (1972) 89 |
| 31. | Jensen, E.V.
Jacobsen, H.J. | Biol. activ. of steroids in
relation to cancer
Acad. Press (1960) 161 |
| 32. | Jensen, E.V.
Jacobsen, H.J. | Rec. Progr. in Hormon Res.
18 (1962) 387 |
| 33. | Wenzel, M. | Hoppe Seylers Z. Phys. Ch.
352 (1971) 1725 |
| 34. | Gurpide, E.
Welch, M. | J. Biolog. Chem.
244 (1969) 5159 |
| 35. | Talalay, P. | Rec. Chem. Progr.
18 (1957) 31 |
| 36. | Jensen, E.V.
Jacobsen, H.J. | Rec. Progr. in Hormon Res.
18 (1962) 387 |
| 37. | Siitoni, P.K.
Ashby, R. | J. of Steroid Bioch.
3 (1972) 459 |
| 38. | Cronholm, T. | Europ. J. Bioch.
27 (1970) 10 |
| 39. | De Hertogh, R., Ekka, E.
Vanderheyden, I. | Acta endocrinolog.
66 (1971) 401 |
| 40. | Breuer, H. | Hoppe Seylers Z. Phys. Ch.
352 (1971) 1206 |
| 41. | Talalay, P.
Williams-Ashman, H. G. | Rec. Progr. in Hormon Res.
16 (1960) 1 |
| 42. | Karavolas, H. J.
Orr, J. C. , Engel, L. L. | J. Biolog. Chem.
244 (1969) 4413 |
| 43. | Wenzel, M.
Pollow, K. , Ziebarth, T. | Z. Naturforschung
22b (1967) 894 |
| 44. | Wenzel, M.
Pollow, K. | Z. Physiol. Chem.
349 (1968) 1357 |

LEBENS LAUF

Am 25.9.1943 wurde ich als letztes von sechs Kindern des Fliesenlegers Bernhard Ahlers und seiner Ehefrau Friederike geb. Bertels in Emsdetten/Westf. geboren.

Nach 4 Volksschuljahren besuchte ich das städt. neusprachliche Gymnasium in Emsdetten, wo ich 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Die Praktikantenzeit absolvierte ich in der Löwen Apotheke in Rheine und bestand im März 1965 das Pharm. Vorexamen vor der Prüfungskommission in Münster.

Bis zum Studienbeginn im Herbst 1967 an der FU Berlin war ich als Vorexaminierter in Rheine und Berlin tätig.

Zwischendurch leistete ich von April 66 bis März 1967 Wehrdienst.

Im Juli 1969 heiratete ich die Kandidatin der Pharmazie Eva-Maria Meier.

Im Herbst 1970 bestand ich vor dem Prüfungsausschuß in Berlin das Pharm. Staatsexamen.

Anschließend begann ich mit der Promotionsarbeit unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wenzel.

Nach Abschluß des praktischen Teils der Dissertation übernahm ich im Januar 1973 als Pächter die Grüne Apotheke in Berlin Charlottenburg.

